

Faculté des sciences

Contrôle génétique de l'auto-incompatibilité et de l'incompatibilité unilatérale chez la tomate

Auteur : Corentin DEFALQUE

Promotrice : Pr Muriel QUINET

Co-promoteur : Charles HACHEZ

Lecteurs : Pr Renate WESSELINGH, Pr François CHAUMONT et Adrien LUYCKX

Laboratoire : Groupe de recherche en physiologie végétale (GPRV/ELIA)

Année académique 2022-2023

Master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire à finalité approfondie

Remerciements

Un mémoire est une œuvre collective...

Pour son aide de tous les instants au laboratoire ou ailleurs, pour ses conseils éclairés, son implication sans faille, son soutien indéfectible, sa disponibilité et l'excellence de sa pédagogie, je remercie très sincèrement ma promotrice, Madame la Professeure Muriel Quinet sans qui la réalisation de ce mémoire n'aurait été possible.

Pour leur encadrement de qualité et leur bienveillance, mais aussi pour l'excellente collaboration et l'ambiance de travail des plus agréables, je remercie chaleureusement Servane Bigot et Pauline Moreels qui, en plus de leur aide précieuse, m'ont appris la rigueur, la précision et m'ont aidé à surmonter quelques-unes de mes maladresses.

Pour leurs conseils qui m'ont permis d'avoir la main un peu plus verte tous les jours ainsi que pour leur apprentissage de la biologie moléculaire, je voudrais remercier Marie-Ève, Paul, Brigitte et toute l'équipe du GRPV.

Pour l'implication et le temps consacré à la lecture de mon mémoire, je remercie l'ensemble du jury, Mesdames Muriel Quinet et Renate Wesselingh et Messieurs François Chaumont, Charles Hachez et Adrien Luyckx

Pour l'entraide et l'esprit collaboratif, je remercie les autres mémorants Anaïs, Dina, Marie-Floriane, Mathilde, Anthony, Martin, Aurélie et Ophélie.

Pour leurs encouragements de tous les instants, pour leur écoute et pour leur soutien indéfectible, je souhaite rendre hommage à mes parents, ma copine, ma famille et mes proches pour qui la biologie végétale est peut-être maintenant un peu moins nébuleuse qu'auparavant.

Résumé

La tomate cultivée (*Solanum lycopersicum*) est la septième culture maraîchère la plus produite au monde. En raison de ses qualités nutritionnelles, la tomate cultivée présente un intérêt agronomique important. Cependant, sa domestication a favorisé les traits phénotypiques bénéfiques à l'agronomie au profit de la diversité génétique. La sélection artificielle par l'homme a fait perdre de nombreux gènes liés à la reproduction, à la résistance aux stress abiotiques et biotiques. La sensibilité aux stress abiotiques et biotiques est devenue le facteur limitant le rendement des cultures.

Solanum chilense est une espèce de tomate sauvage retrouvée au Chili et au Pérou, principalement dans le désert de l'Atacama. Ses gènes de résistance à divers stress, notamment au stress salin et hydrique, lui permettent de pousser dans des conditions extrêmement défavorables. Néanmoins, cette espèce de tomate sauvage présente une auto-incompatibilité gamétophytique (AIG) la rendant difficile à sélectionner et à domestiquer.

L'amélioration du rendement des cultures de *Solanum lycopersicum* pourrait se faire naturellement par introgression de gènes héréditaires d'espèces de tomates sauvages. Plusieurs espèces de tomates sauvages ont déjà été utilisées pour créer des variétés plus résistantes et plus productives que les variétés actuelles. Toutefois, l'introgression ne peut se faire que si les espèces sont hybridables. Dans le clade de la tomate, de nombreuses barrières à la reproduction existent et se chevauchent avec l'auto-incompatibilité de certains membres du clade. Ces barrières se nomment incompatibilité unilatérale (IU).

Ce mémoire porte sur l'étude des mécanismes génétiques liés à l'auto-incompatibilité et l'incompatibilité unilatérale entre *S. lycopersicum*, *S. chilense* et leurs hybrides. Différents croisements et rétrocroisements ont été réalisés entre *S. lycopersicum*, *S. chilense* et leurs hybrides et la croissance des tubes polliniques a été suivie afin de déterminer les croisements compatibles et incompatibles. Les allèles responsables de l'AIG (S-allèles) ont été identifiés chez les hybrides. Le déterminant femelle de l'AIG (S-RNase) a été caractérisé et modélisé en trois dimensions. De plus, son histoire évolutive a pu être tracée. Finalement, l'expression de *DIR1L*, un gène lié à l'IU, a été quantifiée dans les organes sexuels de *S. lycopersicum*, *S. chilense* et leurs hybrides.

Concernant l'AIG, la compatibilité des individus d'une population de *S. chilense* a été estimée à l'aide de croisements et certains S-allèles de *S. chilense* ont pu être prédits dans notre population. La structure tridimensionnelle de la S-RNase de *S. chilense* a été identifiée ainsi que ses régions conservées et hypervariables. Nous avons montré histologiquement et génétiquement que malgré la présence d'une seule S-RNase fonctionnelle, l'AIG existe chez les hybrides et que lors de croisements entre plantes ayant le même S-allèle, la croissance des tubes polliniques s'arrête dans le premier tiers du style.

Pour l'IU, nous avons observé que le site du rejet du pollen est dépendant de l'espèce et ne se produit pas forcément dans le même tiers du style que pour l'AIG. Les S-allèles semblent avoir un impact sur l'intensité et le lieu du rejet des tubes polliniques pour l'IU. Les rétrocroisements ont mis en évidence que les hybrides sont munis d'IU mais leur réponse est complexe. L'existence d'une seule copie de *DIR1L* dans chaque génome séquencé du clade *Lycopersicon* a pu être prouvée. De plus, il a été possible de corrélérer une forte expression de *DIR1L* avec une forte IU dans le clade de la tomate.

En conclusion, l'IU et l'AIG sont des barrières reproductrices pré-zygotiques observées dans le clade de la tomate et l'expression de leurs gènes dans les organes sexuels est complexe et nécessite de plus amples études.

Abstract

The cultivated tomato (*Solanum lycopersicum*) is the seventh most cultivated vegetable crops. Due to its nutritional qualities, the cultivated tomato presents an important agronomic advantage. Nevertheless, the domestication of the cultivated tomato has favoured beneficial agronomic trait over the genetic diversity. A huge number of genes linked to reproduction, to resistance to abiotic and biotic stress were lost due to the artificial selection. Today, the sensitivity to abiotic and biotic stress is the limiting factor for the yield of the culture.

Solanum chilense is a wild tomato species found in Chili and Peru, mostly in the desert of Atacama. Its resistance genes to diverse stress such as salt and drought stress make it easy to grow in extremely harsh conditions. Nevertheless, this species is gametophytic self-incompatible (GSI) making it difficult to domesticate and select.

The yield increase of *Solanum lycopersicum* culture could be done by introgression of heritable genes from wild tomato species. A growing number of wild tomato species are used to create stronger and more resistant varieties. However, the introgression is possible only if hybridisation between two species can be accomplished. For the tomato clade, numbers of reproduction barriers exist. These are called unilateral incompatibility (UI) and are linked to self-incompatibility.

This master thesis investigated the genetical mechanisms linked to self-incompatibility and unilateral incompatibility between *S. lycopersicum*, *S. chilense* and their hybrids. Different crosses and backcrosses were done between *S. lycopersicum*, *S. chilense* and their hybrids to identify compatible and incompatible crosses and the pollen tube growth was followed. The GSI alleles of hybrids were identified. The female determinant of GSI (S-RNase) was characterized, modeled in three dimensions and the evolutive history could be traced. Finally, the expression of *DIR1L*, a gene linked to UI, was measured for the sexual organs of *S. lycopersicum*, *S. chilense* and their hybrids.

Regarding GSI, the compatibility between the different individuals of our *S. chilense* population was identified thanks to the different crosses and some S-alleles were predicted in the population. The tri-dimensional structure of the *S. chilense* S-RNase was discovered as well as its conserved and hypervariable regions. For the hybrids, the GSI could be demonstrated histologically and genetically despite the presence of only one functional S-RNase. In crosses between plants with the same S-allele, pollen tube growth stopped in the first third of the style.

For the UI, we observed that the site of pollen rejection is species-dependent and does not necessarily occur in the same third of the style as for GSI. S-alleles seem to have an impact on the intensity and location of pollen tube rejection for UI. Backcrosses have shown that hybrids have UI but their response is complex. The existence of only one copy of *DIR1L* in every *Lycopersicon* sequenced genome was discovered. Moreover, a link was found between the expression of *DIR1L* and the UI response in the tomato clade.

To conclude, UI and GSI are pre-zygotic reproductive barriers observed in the tomato clade and the expression of their genes in the sex organs is complex and requires further study.

Table des matières

INTRODUCTION.....	1
1. LA TOMATE.....	1
1.1. GÉNÉRALITÉS SUR LA TOMATE.....	1
1.2. <i>SOLANUM LYCOPERSICUM</i> L.	2
1.3. <i>SOLANUM CHILENSE</i> DUN.....	4
1.4. GÉNÉTIQUE DE LA TOMATE	6
1.5. INTROGRESSION CHEZ LA TOMATE	7
2. BARRIÈRE REPRODUCTRICE CHEZ LA TOMATE.....	9
2.1 L'AUTO-INCOMPATIBILITÉ	9
2.2 L'AUTO-INCOMPATIBILITÉ GAMÉTOPHYTIQUE CHEZ LES SOLANACEAE	10
2.3 L'INCOMPATIBILITÉ UNILATÉRALE CHEZ LES ESPÈCES DU GENRE <i>SOLANUM</i>	12
2.4 L'AUTO-COMPATIBILITÉ CHEZ LES ESPÈCES DE TOMATES.....	13
OBJECTIFS DU MÉMOIRE	14
MATÉRIEL ET MÉTHODES	15
MATERIEL VEGETAL ET CONDITIONS DE CULTURE :	15
CROISEMENTS.....	15
ÉTUDE HISTOLOGIQUE DES BARRIÈRES PRE-ZYGOTIQUES DES CROISEMENTS INTRA ET INTERSPECIFIQUES POUR <i>SOLANUM LYCOPERSICUM</i> , <i>SOLANUM CHILENSE</i> ET LEURS HYBRIDES.....	16
IDENTIFICATION DES S-RNASES CHEZ <i>S. CHILENSE</i>	16
IDENTIFICATION ET REPARTITION DES S-ALLELES DES HYBRIDES	20
ÉTUDE DE L'EXPRESSION DU GENE <i>DIR1L</i> PAR RT-QPCR	21
ANALYSE BIO-INFORMATIQUE DES S-RNASES ET DE <i>DIR1L</i>	23
ANALYSE STATISTIQUE.....	23
RÉSULTATS	24
PARTIE 1 : AUTO-INCOMPATIBILITÉ	24
A - LES S-RNASES CHEZ <i>SOLANUM CHILENSE</i>	24
Identification des S-RNases dans la population de <i>S. chilense</i>	24
Identification des compatibilités dans la population de <i>S. chilense</i> par croisements.....	28
Analyse bio-informatique des S-RNases de <i>S. chilense</i>	29
B – LES S-RNASES CHEZ LES HYBRIDES	34
Identification et répartition des S-allèles dans la population d'hybrides.....	34
Croissance des tubes polliniques pour les croisements entre hybrides.....	34
PARTIE 2 : INCOMPATIBILITÉ UNILATÉRALE.....	36
CROISEMENTS ENTRE <i>S. LYCOPERSICUM</i> ET <i>S. CHILENSE</i>	36
RÉTROCROISEMENTS ENTRE LES HYBRIDES ET LEURS PARENTS	37
PARTIE 3 : EXPRESSION DE <i>DIR1L</i>.....	40
ARBRE PHYLOGÉNÉTIQUE.....	40
RT-QPCR	40
DISCUSSION.....	42
S-RNASE	42
Structure.....	42
Diversité.....	42
Difficulté d'amplification.....	43
AUTO-INCOMPATIBILITE.....	43
<i>Solanum chilense</i>	43
Les hybrides	45
Croissance des tubes polliniques	46

INCOMPATIBILITE UNILATERALE	46
<i>Règle AC x AI</i>	46
<i>Les hybrides : rétrocroisements et croissance des tubes polliniques</i>	47
<i>DIR1L</i>	48
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	50
BIBLIOGRAPHIE	52
ANNEXES	57
ANNEXE S1 : LISTES DES SEQUENCES CONSENSUS UTILISES POUR LA FORMATION DES AMORCES DES S-ALLELES	57
ANNEXE S2 : ALIGNEMENT DES S-RNASES DE CHAQUE S-ALLELE CONNU POUR <i>S. CHILENSE</i>	59
ANNEXE S3 : ALIGNEMENT DE <i>DIR1L</i> DANS LE CLADE DE LA TOMATE	63

Introduction

1. La tomate

1.1. Généralités sur la tomate

La tomate cultivée (*Solanum lycopersicum*) appartient à la famille des Solanaceae et est considérée comme la septième culture maraîchère la plus produite au monde (Fernandes et al., 2018). La famille des Solanaceae est la première source alimentaire après les céréales (Gilgenkrantz., 2012). Plus de 182 millions de tonnes de tomates sont produites chaque année (FAO., 2021). Lors de ces dernières années, la production de tomates a été en croissance constante.

En raison de ses qualités nutritionnelles, la tomate cultivée présente un intérêt agronomique important. Elle contient des acides aminés essentiels (valine, histidine, arginine, lysine, thréonine, leucine), des graisses monoinsaturées (acide linoléique et alpha-linoléique), des caroténoïdes (bêta-carotène, lycopène), des composés phénoliques, des flavonoïdes et des phytostérols (Ali et al., 2020). Parmi toutes ces molécules bénéfiques pour la santé humaine, le lycopène jouerait un rôle de protection contre le cancer, les maladies cardio-vasculaires, l'ostéoporose et les maladies neuro-dégénératives (Ali et al., 2020, Gerszberg et al., 2015).

La tomate cultivée est originaire des Andes en Amérique du Sud. Son importation date du XVI^{ème} siècle en Europe. Sa domestication a démarré au Mexique durant la conquête du pays par l'Espagne (Gilgenkrantz., 2012).

Solanum lycopersicum L. fait partie du clade *Lycopersicon* au sein du genre *Solanum*, c'est-à-dire le clade des tomates. Ce clade comprend 12 autres espèces telles que *Solanum chilense*, *Solanum pennelli* ou *Solanum peruvianum*. Les espèces sauvages du clade *Lycopersicon* sont présentes dans les environnements désertiques ou semi-secs de la pente Est des Andes (Knapp et al., 2016). Phylogénétiquement, l'espèce la plus proche de la tomate cultivée est *Solanum pimpinellifolium* (Knapp et al., 2016).

La domestication de la tomate cultivée a favorisé les traits phénotypiques bénéfiques à l'agronomie. En comparaison à son ancêtre sauvage, la diversité génétique de la tomate a grandement diminué. La raison de cette perte est le goulot d'étranglement provoqué par la sélection artificielle. Certains gènes liés à la reproduction, à la résistance aux stress biotiques et abiotiques ont été perdus au profit d'une augmentation de la productivité (Sim et al., 2011).

Par conséquent, *Solanum lycopersicum* est sensible à de nombreux stress biotiques (attaques de virus, insectes, champignons,...) ou abiotiques (salin, hydrique, thermique,...). Ces stress sont devenus le facteur limitant le rendement de sa culture (Rezk et al., 2021). Néanmoins, cette sensibilité accrue aux stress est une exception dans le clade des *Lycopersicon*. Les espèces de tomates sauvages sont riches en gènes de résistance aux stress abiotiques et biotiques (Rezk et al., 2021).

Toutefois, l'amélioration végétale de *Solanum lycopersicum* face à ces stress est possible, notamment par introgression de gènes héritables d'espèces de tomates sauvages. Cette sélection permettrait de produire des variétés plus résistantes et plus productives que les variétés actuelles. Des espèces sauvages comme *Solanum pimpinellifolium* ont par exemple déjà été utilisées pour créer des variétés résistantes à *Cladosporium fulvum* (Rezk et al., 2021).

Le processus de recherche et de sélection de traits phénotypiques avantageux est long et difficile, même sans introgression. Par exemple, la sélection de variétés de *Solanum*

lycopersicum mécaniquement récoltables aura nécessité plus d'une vingtaine d'années pour proposer des individus avec un phénotype intéressant (Sim et al., 2011).

La tomate cultivée représente également un intérêt scientifique important. Cet organisme est fortement étudié dans le domaine de la génomique végétale. *S. lycopersicum* possède toutes les qualités d'un organisme modèle : cycle de vie court, auto-compatibilité, adaptation à de nombreuses conditions environnementales, petit génome, peu de gènes dupliqués, grande production de graines (Kashyap et al., 2021). Une grande collection de mutants est accessible pour l'étude des gènes d'intérêt (Saito et al., 2011). Des lignées introgressées sont aussi disponibles : les recombinaut inbred lines (RILs) et backcross inbred lines (BILs) sont utiles pour étudier l'introgression progressive d'un segment de chromosomes d'une autre espèce dans le génome de la tomate cultivée (Lippman et al., 2007).

1.2. *Solanum lycopersicum* L.

La tomate cultivée ou *Solanum lycopersicum* est une plante à croissance sympodiale. La plante fleurit après la formation de 8 à 12 feuilles. Le méristème apical arrête la production de feuilles pour devenir un méristème inflorescentiel. Ce méristème produira la première inflorescence. Le méristème axillaire de la dernière feuille formée (appelé segment sympodial) reprendra la croissance en hauteur et l'inflorescence sera rejetée sur le côté. Trois feuilles sont produites par le méristème sympodial avant de se transformer à son tour en méristème inflorescentiel. La croissance se poursuit par le développement de segments sympodiaux successifs (Figure 1) (Quinet et Kinet., 2007).

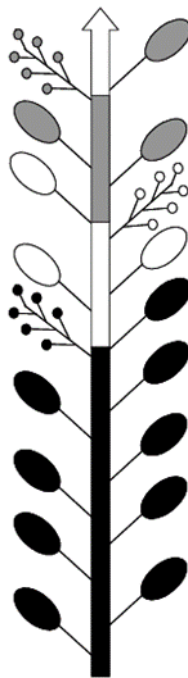


Figure 1 : Croissance sympodiale de *Solanum lycopersicum*. Les organes schématisés en noir sont les organes initiaux formés par un méristème apical. Les autres couleurs sont les organes formés par un méristème sympodial. Ellipse = feuille, rectangle = tige principale, cercle = fleurs (Quinet et Kinet., 2007).

Selon la variété de tomate, la croissance est déterminée ou indéterminée. Les cultivars avec une croissance déterminée ont un aspect buissonnant, érigé et utile pour la culture en champs. Leurs tailles ne dépassent jamais 2 mètres de hauteur (Picken et al., 1986). Les variétés avec une

croissance déterminée se finissent par la production de 2 inflorescences consécutives dans le dernier segment sympodial (Quinet et Kinet., 2007). Pour les cultivars à croissance indéterminée, les variétés peuvent atteindre jusqu'à 10 mètres de hauteur. Leurs floraisons et fructifications sont régulières. Leurs cultures sont plus intéressantes en serre (Picken et al., 1986).

La tige adulte de tomate fait en moyenne 4 cm de diamètre. Elle est couverte ou non de poils glandulaires. Les feuilles sont alternes, composées, profondément découpées avec une phyllotaxie de 2/5 (144° entre chaque feuille). Une feuille mature mesure en moyenne 50 cm de long pour 50 cm de large et possède entre 5 et 7 folioles en fonction du cultivar en plus d'une foliole terminale (Figure 2B) (Picken et al., 1986).

Une inflorescence porte 5 à 12 fleurs (Ephytia., 2022). La fleur est hermaphrodite et actinomorphe (Figure 2C-E). Elle contient 5 à 6 sépales fusionnés à la base et formant un tube. La corolle contient 5 à 6 pétales. L'androcée est attaché à la base de celle-ci par des filaments élargis. Les 5 à 6 étamines sont fusionnées entre elles pour ne former qu'un cône creux enfermant l'organe femelle. Le pistil est central. Il contient 2 carpelles (parfois plus chez certains cultivars) qui se prolongent en un long et unique style se terminant par un stigmate plat (Figure 2C-E) (Quinet et Kinet., 2007). Le fruit mesure entre 1,5 et 10 cm de diamètre en fonction des cultivars. Il est jaune, orange ou rouge lorsqu'il arrive à maturité. Il est soutenu par un pédicelle de 1,5 à 3 cm (Figure 2F) (Peralta et al., 2008).

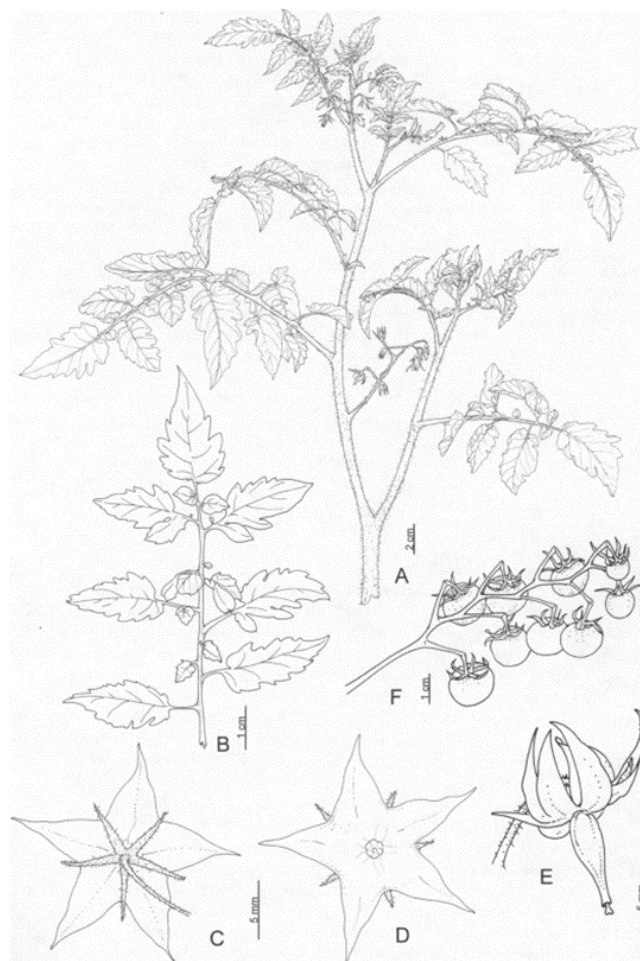


Figure 2: Dessin schématique de *Solanum lycopersicum* : organes végétatifs et reproducteurs. A = plante entière, B = feuille, C= vue abaxiale de la fleur, D= vue adaxiale de la fleur, E= vue latérale de la fleur, F = infrutescence (Peralta et al., 2008).

1.3. *Solanum chilense* Dun.

Solanum chilense est une herbacée pérenne de la famille des Solanaceae. Son port est variable, allant d'érigé à décombant. Cette plante est principalement présente au Pérou, au Chili et à l'ouest de la Bolivie (Figure 3) (Raduski et al., 2021).

Cette espèce est répartie en 3 groupes majeurs avec des conditions de sols et de climats différentes. Le premier groupe est côtier (0 à 1000m). Il occupe des canyons larges en dessous de collines capturant le brouillard. Ce groupe longe la côte de l'Océan Pacifique au Chili sur 600 km et démarre du Sud d'Iquique jusqu'à Taltal (Figure 3) (Raduski et al., 2021).

Les autres groupes se trouvent à l'intérieur des terres. En effet, le deuxième groupe démarre du nord du salar de l'Atacama et remonte jusqu'au centre du Pérou (800 à 2000m). Le troisième groupe se situe sur les pentes Ouest de la cordillère des Andes (2000-3600m). En règle générale, ce sont les groupes montagnards les plus denses. Les individus sont aussi plus larges (Figure 3) (Raduski et al., 2021).

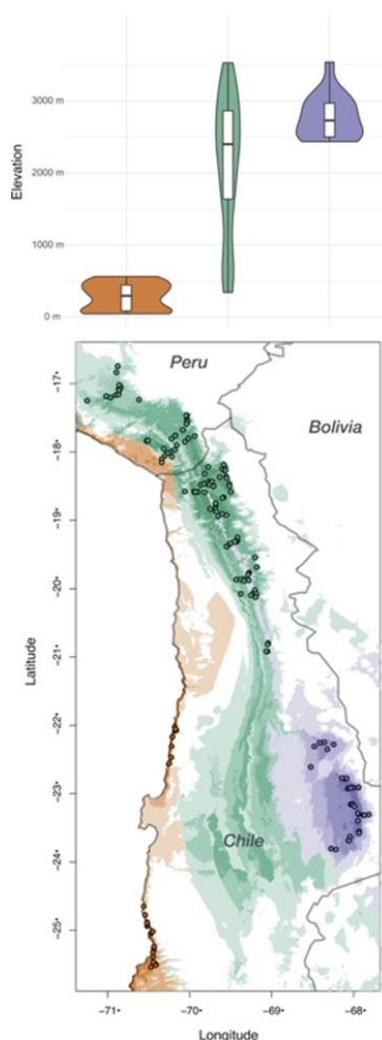


Figure 3 : Distribution géographique des 3 groupes de *Solanum chilense* de Bolivie, du Chili et du Pérou. Brun = groupe côtier (0-1000m), vert = population de l'Atacama (800 à 2000m), mauve = population de la cordillère des Andes (2000 à 3600m). Les axes des ordonnées représentent l'altitude et la latitude. À droite, l'axe des abscisses représente la longitude où se distribuent les populations. Les cercles définissent les points de recensements sur la carte (Raduski et al., 2021).

Solanum chilense est capable de survivre dans des environnements arides avec des précipitations annuelles de moins de 20 mm. La tige principale adulte mesure entre 8 et 12 mm de diamètre et est densément fournie en trichomes (Tapia et al., 2016).

Les feuilles de *Solanum chilense* sont alternes. Elles contiennent 5 à 7 folioles recouvertes densément de trichomes blancs avec un large pétiole (Rick et al., 1955). Leur longueur peut varier entre 5 et 20 cm de long pour 2,5 à 10 cm de large lorsqu'elles sont matures. Les folioles sont plus marquées chez les feuilles les plus âgées et sont quasiment inexistantes pour les premières feuilles. Des folioles secondaires se développent plus tard lorsque les feuilles deviennent de plus en plus grandes (Figure 4A-F) (Peralta et al., 2008).

L'inflorescence mesure entre 6 et 30 cm et génère en moyenne 12 fleurs. Cependant, des bifurcations ont tendance à se créer au sein de l'inflorescence. Celles-ci augmentent considérablement le nombre de fleurs produites (Figure 4C-E) (Peralta et al., 2008).

Les fleurs sont hermaphrodites. La corolle possède 5 pétales et un calice de 5 sépales. Les 5 anthères sont soudées et forment un cône d'où le pistil en sort (Figure 4C-E) (Peralta et al., 2008).

Les fruits sont verts blanchâtres avec parfois des rayures légèrement mauves. Leur diamètre varie de 1 à 1,5 cm et ils ont des trichomes blancs (Figure 4B) (Peralta et al., 2008). *Solanum chilense* est auto-incompatible. Le pollen déposé sur le pistil d'une fleur provenant du même individu sera automatiquement rejeté par un mécanisme de reconnaissance du soi (Peralta et al., 2008).



Figure 4 : Dessin schématique de *Solanum chilense* : organes végétatifs et reproducteurs. A = plante entière, B = fruit, C= vue abaxiale de la fleur, D= vue adaxiale de la fleur, E= vue latérale de la fleur (Peralta et al., 2008).

1.4. Génétique de la tomate

La tomate (*Solanum lycopersicum*) est une espèce modèle pour l'étude des gènes de dicotylédones. Elle possède un génome de 950 Mb de 12 chromosomes (2n) entièrement séquencé et annoté (Gerszberg et al., 2015). Ce séquençage a été réalisé par le consortium du génome de la tomate (CGT). Le projet a été mené dans 14 pays différents par plus de 300 chercheurs sur la variété « Heinz 1706 » (Gerszberg et al., 2015). Plus tard, de nombreuses autres variétés et espèces ont été séquencées par Next Generation Sequencing. Le Solanum Genomic Networks regroupe les génomes et outils génomiques associés aux différentes espèces et variétés de tomate (<https://solgenomics.net/>).

Sur les 950 Mb, 75% de l'ADN est présent sous forme d'hétérochromatine au centre du génome. Le nombre d'éléments répétés est plus important autour des centromères. L'euchromatine est distale. Le nombre de gènes codants pour une protéine s'élève à plus ou moins 35 000, dont 96 codent des micro-ARN (Sato et al., 2012, Shibata., 2005).

Le génome de la tomate est fortement synténique avec les autres Solanaceae économiquement importantes. Ce haut degré de synténie est utile pour transposer aux autres Solanaceae du groupe certaines découvertes faites sur la tomate (Figure 5) (Sato et al., 2012).

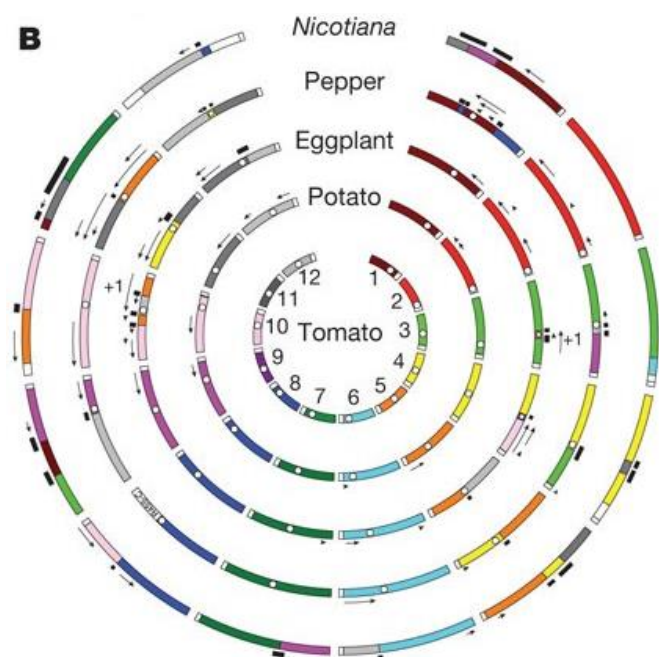


Figure 5 : Synténie entre *Solanum lycopersicum* et les autres Solanaceae d'intérêt économique. Chaque couleur représente un chromosome de la tomate. Des couleurs similaires représentent des sections orthologues dans d'autres espèces des chromosomes de la tomate (Sato et al., 2012)

L'analyse du génome par Next Generation Sequencing (NGS) a révélé 2 événements de polyploïdisation. Ces événements correspondent à une triplification du génome il y a 60 millions d'années. Néanmoins, il ne reste que peu de gènes dupliqués dans le génome actuel (Gilgenkrantz., 2012). Une hypothèse voudrait que cette triplification aurait une corrélation avec la survie de l'espèce durant l'extinction du Crétacée il y a 65 millions d'années (Gilgenkrantz., 2012).

1.5. Introgression chez la tomate

L'introgression est définie comme l'intégration d'allèles d'une espèce A dans le pool génétique d'une espèce B. Au fur et à mesure des croisements interspécifiques, les allèles d'un locus A vont progressivement s'insérer dans un pool d'allèles d'un autre locus homologue (Figure 6). Cependant, pour que l'introgression soit un succès, il faut que la portion du pool génétique définissant une espèce ne se fasse pas remplacer par le pool génétique de l'autre espèce. Si c'est le cas, l'identité génétique des individus introgressés serait compromise (Harrison et al., 2014, Lippman et al., 2007).

Pour pouvoir introgresser, il faut que les espèces puissent s'hybrider. L'hybridation entre 2 espèces est utile pour former un pont d'allèles neutres ou positifs provenant d'une espèce vers une autre espèce.

L'hybridation doit produire des hybrides fertiles pouvant à nouveau polliniser le parent femelle. Après cela, une série de rétrocroisements sera faite entre les hybrides de plus en plus dilués génétiquement et le parent femelle. A la fin du processus, une nouvelle génération de plantes sera sélectionnée pour ne contenir que les allèles les plus intéressants pour la plante cultivée (Figure 6) (Hindorf., 2011, Lippman et al., 2007).

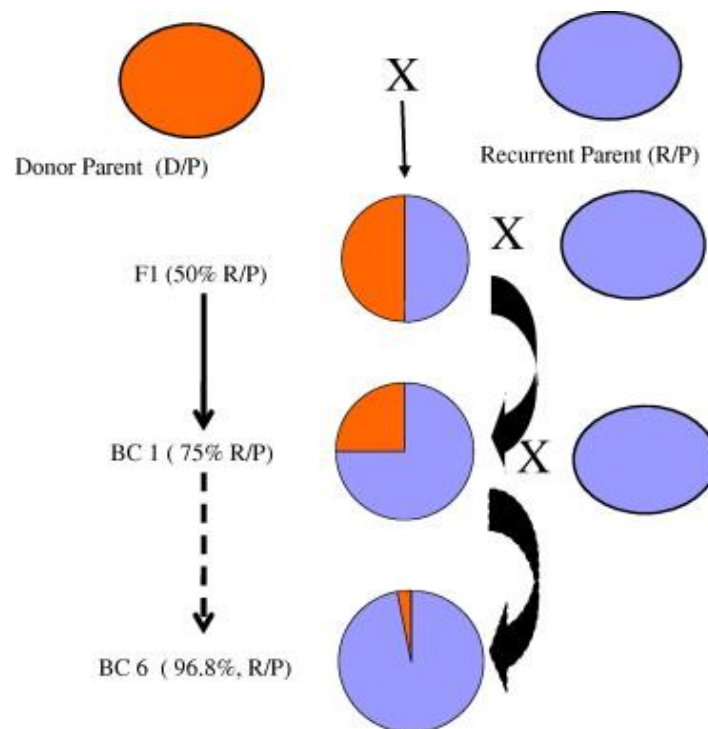


Figure 6: Introgression entre 2 espèces capables de s'hybrider. D/P = parent de l'espèce donneuse d'allèles, R/P = parent de l'espèce receveuse d'allèles. F1 = première génération d'hybride, BC1-6 = génération de rétrocroisements (Hindorf et al., 2011).

Chez la tomate, l'introgression est intéressante pour insérer dans le génome des allèles de résistance aux stress biotiques et abiotiques ainsi que pour la productivité (Lippman et al., 2007).

Ces 20 dernières années, l'espèce candidate la plus étudiée pour l'introgression de gènes fût *Solanum pennellii*. Les raisons étaient sa compatibilité avec *S. lycopersicum*, sa facilité à faire

des hybrides fertiles et ses gènes intéressants pour le métabolisme de la tomate (Brog et al., 2019).

Plusieurs candidats à de futures introgressions sont envisageables. Parmi ceux-ci, *Solanum chilense* pourrait être un profil idéal. Cette plante résiste à de nombreux stress abiotiques (salin, thermique et hydrique) et biotiques (attaques de pathogènes) (Pérez de Castro., 2013). Des gènes provenant de *Solanum chilense* ont déjà été introgressés dans certains cultivars. Le gène *Ty-1* par exemple a déjà été inséré chez les cultivars ‘Muchamiel’ et ‘De la Pera’ pour apporter une résistance au virus des feuilles jaunes en cuillère de la tomate (*Begomovirus*) (Rubio et al., 2016).

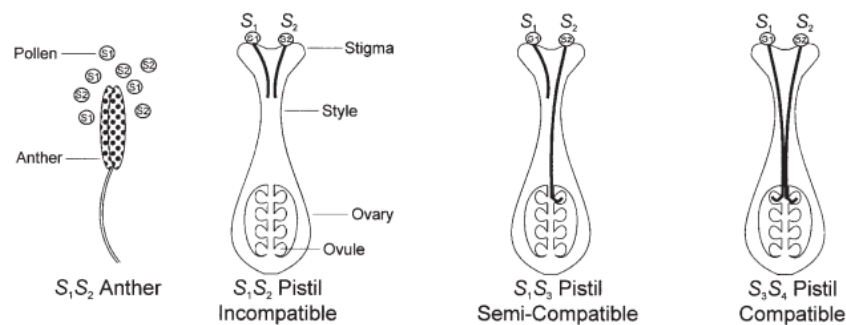
2. Barrière reproductrice chez la tomate

2.1 L'auto-incompatibilité

L'auto-incompatibilité (AI) est définie chez les angiospermes comme l'incapacité à former un zygote lorsque la fécondation s'effectue par son propre pollen (Zhao et al., 2022). Ce mécanisme biologique a pour objectif de conserver la diversité génétique au sein de la population. La réponse d'AI comprend un mécanisme de reconnaissance du soi et du non-soi entre le pistil et le pollen. Chez un grand nombre d'espèces, la reconnaissance du soi est dirigée par un seul locus multi allélique appelé le « S-allèle ». Ce locus serait composé d'au minimum 2 unités de transcriptions, la première agissant comme le déterminant mâle et la seconde comme le déterminant femelle. Différents S-allèles existent pour ce même S-locus. L'AI intervient lorsque le pollen possède le même S-haplotype que le pistil. Il est alors considéré comme appartenant au « soi » et la fécondation n'est pas possible (Takaya et al., 2005).

Il existe 2 types d'AI dans le monde des angiospermes : l'auto-incompatibilité gamétophytique (AIG) et sporophytique (AIS). Pour l'AIG, le génome haploïde du pollen détermine le phénotype de l'AI. Leurs croisements peuvent être incompatibles, semi-compatibles ou compatibles. Pour l'AIS, le génome diploïde du parent reproducteur mâle détermine le phénotype de l'AI. Leurs croisements sont soit incompatibles ou compatibles (Figure 7) (Takaya et al., 2005).

A. Gametophytic Self-Incompatibility



B. Sporophytic Self-Incompatibility

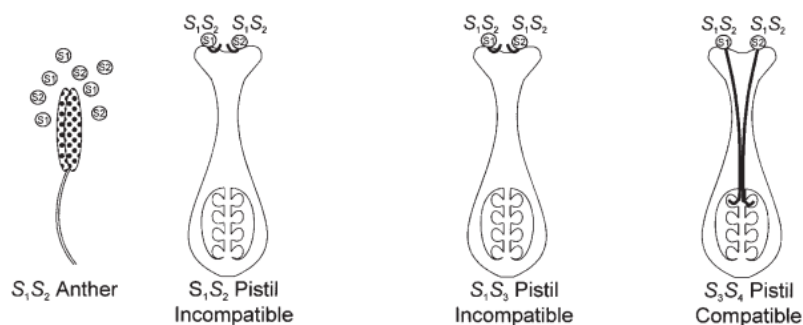


Figure 7 : A : Schéma de l'auto-incompatibilité gamétophytique. Les anthères produisent des grains de pollen avec des S-allèles S1 ou S2. La croissance du tube pollinique s'arrête si le S-allèle du pollen (haploïde) est similaire aux S-allèles dans le style. A l'inverse, le tube pollinique continue à croître si le S-allèle du pollen est différent des S-allèles du style. Pistil de gauche = croisement incompatible, pistil du milieu = croisement semi-compatible, pistil de droite = croisement compatible. B : Schéma de l'auto-incompatibilité sporophytique. Les protéines des 2 S-allèles sont présentes dans chaque pollen. Ainsi, le phénotype diploïde S1 S2 de l'anthère détermine si le pollen est arrêté à la surface ou non. Lorsque les S-allèles sont similaires, le pollen ne développe pas de tube pollinique. Si les S-allèles sont différents, la croissance du tube pollinique peut commencer. Pistil de gauche et milieu = croisement incompatible, pistil de droite = croisement compatible (Silva et al., 2001).

L'AIG est le système le plus répandu. Il est présent dans plus de 60 familles dont les Solanaceae. L'AIS est plus rare mais elle est présente dans des familles d'intérêt agronomique important comme les Brassicaceae (Silva et al., 2001).

L'AI peut aussi se manifester par des caractéristiques physiques secondaires. Par exemple, la fleur peut développer des barrières à la reproduction en étant longistyle ou brévistyle (cas d'hétérostylie). Ces dispositions diminuent les probabilités que les organes mâles et femelles se fécondent (Silva et al., 2001).

2.2 L'auto-incompatibilité gamétophytique chez les Solanaceae

Dans la famille des Solanaceae, le S-locus contient un déterminant femelle et plusieurs déterminants mâles et l'AI suit le modèle « collaborative non-self-recognition » : les déterminants femelles du 'non-soi' sont reconnus et dégradés par les déterminants mâles tandis que les déterminants femelles du 'soi' restent actifs et empêchent la croissance du tube pollinique (Zhao et al., 2022).

Le déterminant femelle de l'AIG est une ribonucléase de 30 kDa appelée « S-RNase » (Fuji et al., 2016). La S-RNase est présente principalement dans le style de la fleur et en moindre quantité dans le stigmate. Elle dégrade tous les ARNs des tubes polliniques ayant le même S-allèle. La séquence des S-RNases de Solanaceae contient une région peptide signal (SP), 5 régions conservées (C1 à C5) et 2 régions hypervariables (Hva, b) (Figure 8). Les variations d'acides aminés au sein des S-RNases sont dépendantes du S-allèle. Les variations d'acides aminés entre les S-allèles sont possibles car 4 régions dans la séquence sont sous sélections positives (PS1 à 4) (Figure 8). Chez les Solanaceae, on estime que chaque espèce contient entre 10 et 50 S-haplotypes différents. *Solanum chilense* posséderait entre 31 et 40 S-allèles différents répartis dans toutes les populations existantes (Igic et al., 2007, Richman et Khon., 2000). La conservation de la séquence en acides aminés entre S-RNases d'un même S-haplotype est de minimum 38% entre les différentes espèces. Par contre, la séquence en acides aminés des S-RNases est extrêmement variable entre S-haplotypes au sein d'une même espèce. Néanmoins, la conservation peut atteindre un maximum de 93% entre 2 séquences au sein d'une même espèce (Li et al., 2014, Silva et al., 2001, Tao et al., 2010). Les régions conservées C1, C4 et C5 forment la structure cœur de la S-RNase. Les régions conservées C2 et C3 contiennent 2 histidines catalytiques similaires aux ribonucléases fongiques T2. La région C2 possède aussi une asparagine avec un rôle d'attachement à des N-glycanes (Figure 8) (Silva et al., 2001). Malgré les grandes variations de séquences des S-allèles, 7 à 10 cystéines seraient conservées. Leurs rôles seraient de stabiliser les ponts disulfures et la structure tertiaire de la glycoprotéine. Les régions hypervariables Hva et Hvb conserveraient une nature hydrophile malgré leur grande variation (Figure 8) (Silva et al., 2001).

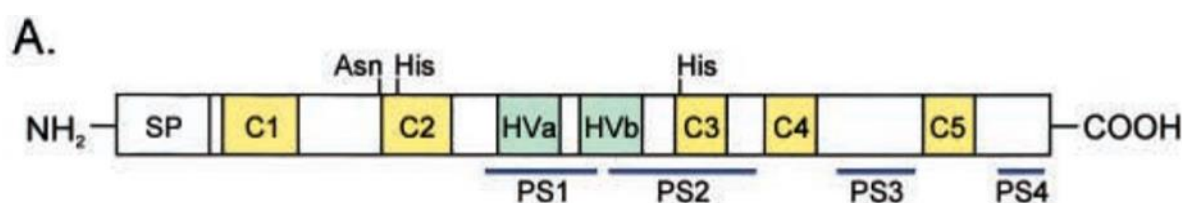


Figure 8 : Schéma de la structure primaire de la S-RNase chez les Solanaceae. SP = peptide signal, PS1 à 4 = région sous sélection positive, C1 à C5 = région conservée, Hva,b = région hypervariable. Les histidines catalytiques et l'asparagine impliquée dans la N-glycosylation sont présentes sur le schéma (Silva et al., 2001).

Chez les Solanaceae, le S-locus contiendrait plusieurs déterminants mâles ; ce sont des protéines F-box appelées S-locus F-box (SLF) (Fuji et al., 2016). Pour le genre *Solanum* et *Petunia*, chaque S-haplotype code en moyenne pour 20 SLFs paralogues. Ces SLFs font partie du complexe E3 ubiquitine ligase (SCF) composé de 3 sous-unités : Skp1, Cullin1 et SLF (bien qu'intervenant dans l'AI, les protéines Skp1 et Cullin1 ne font pas partie du S-locus). Ce complexe poly-ubiquitine les protéines avant dégradation par le protéasome 26S (Figure 9) (Fuji et al., 2016). Au sein de ce complexe, la sous-unité SLF est le substrat de reconnaissance entre la S-RNase et le complexe SCF. Les différentes SLFs interagissent plus ou moins spécifiquement en fonction des S-haplotypes des S-RNases. Cette reconnaissance mènera à la dégradation des S-RNases ayant un S-haplotype différent afin de permettre la croissance du tube pollinique (Figure 9). L'interaction d'une SLF sur la S-RNase s'effectue sur un domaine conservé chez toutes les S-RNases et sur une région hypervariable (Li et al., 2014, Tao et al., 2010).

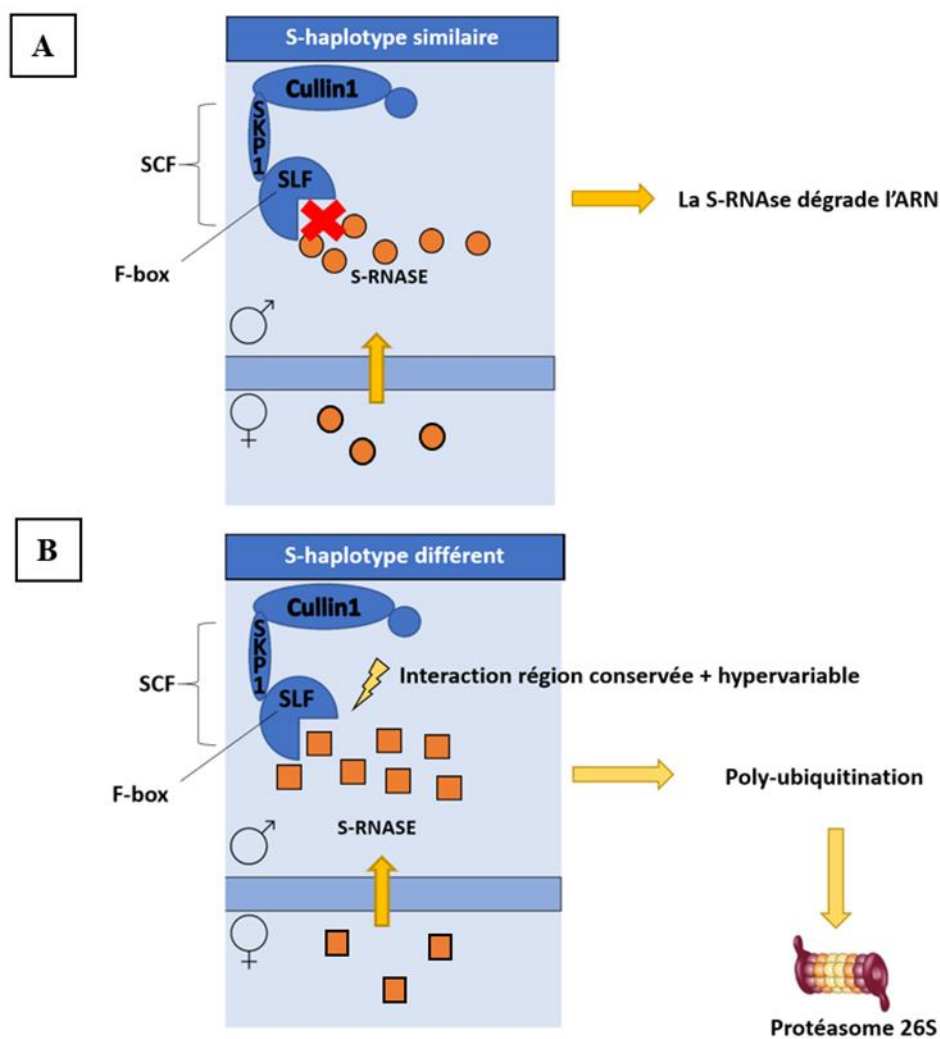


Figure 9 : Représentation de la reconnaissance des S-RNases par les SLFs induisant ou non une détoxification dans le tube pollinique. (A) Les S-RNases (orange) rentrent dans le tube pollinique et dégradent l'ARN quand les S-allèles sont similaires. (B) Les S-RNases se font poly-ubiquitiner par le complexe SCF (bleu foncé) quand les S-allèles diffèrent. L'interaction (éclair jaune) se fait sur une région conservée et une région hypervariable à la S-RNase. La dégradation se fait dans le protéasome 26S (cylindre tricolore).

Cependant, la régulation de l'AIG ne s'arrête pas là. Des gènes modificateurs peuvent réguler l'expression du S-locus. Le nombre de ces gènes est variable. Chez *Solanum lycopersicum*, on en dénombre 19 alors que chez *Solanum pennellii*, il en existe 23 (Li et al., 2015). Le rôle de tous les gènes modificateurs n'est pas encore connu à ce jour. Cependant, certains d'entre eux ont été étudiés en raison de leur importance dans l'AIG. C'est le cas de (1) Na-StEP, un inhibiteur de sérine protéase et une protéine bloquant les canaux de potassium voltages-dépendant, (2) HT-A et HT-B, des glycoprotéines de 120kb riches en asparagine et (3) NaThrx, un inhibiteur de protéase. Lorsque ces protéines ne sont pas codées, l'AI ne semble plus être fonctionnelle (Jiménez-Durán., 2013, Kondo et al., 2002).

2.3 L'incompatibilité unilatérale chez les espèces du genre *Solanum*

Bien que la plupart des espèces du clade de la tomate peuvent s'hybrider, certaines barrières interspécifiques existent. On parle dans ce cas d'incompatibilité unilatérale (IU) (Muñoz-Sanz et al., 2021). La règle générale est que le rejet du pollen s'effectue lorsque le parent femelle est auto-incompatible (AI) et que le parent mâle est auto-compatible (AC). A l'inverse, le croisement AC x AI est compatible (Qin et al., 2018). De plus, il a été remarqué empiriquement que les *Lycopersicon* à fruits verts tendent à être AI et les *Lycopersicon* à fruits orange/rouge à être AC (Figure 10) (Muñoz-Sanz et al., 2021).

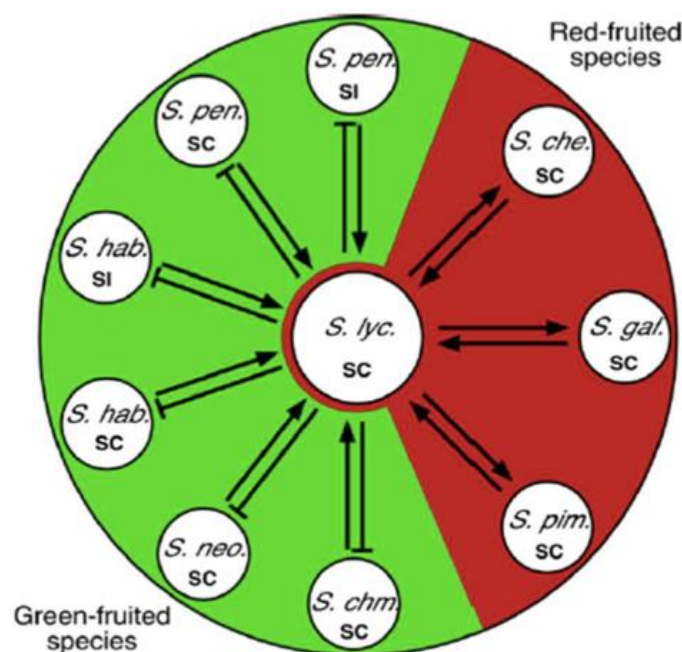


Figure 10 : Compatibilité interspécifique des membres du clade *Lycopersicon*. Les espèces en rouge sont les espèces à fruits rouges et les espèces en vert sont les espèces à fruits verts. Un croisement compatible est représenté par une flèche où la pointe montre l'espèce utilisée comme femelle. Un croisement incompatible est représenté par une flèche avec une ligne perpendiculaire montrant l'espèce utilisée comme femelle (Tovar-Mendez et al., 2014).

Le contrôle de l'IU reste mal compris bien que certains acteurs de la régulation aient été identifiés. Il existerait deux voies contrôlant l'IU, une dépendante des S-RNases et une autre indépendante des S-RNases (Muñoz-Sanz et al., 2021).

Plusieurs QTLs ont été identifiés pour ces 2 voies. 3 QTLs sont présents dans le pistil : *ui1.1* sur le chromosome 1 avec un gène codant pour une S-RNase, *ui12.1* sur le chromosome 12 avec des gènes codant pour HT-A et HT-B et *ui3.1* sur le chromosome 3 codant pour *ODC2* (*ornithine decarboxylase 2*). Une interaction semble exister entre *ui3.1* et *ui12.1* pour renforcer la réponse d'IU (Muñoz-Sanz et al., 2021).

Pour les QTLs du pollen, *ui1.1* sur le chromosome 1 et *ui6.1* sur le chromosome 6 codent pour différentes SLFs et Cullin1 (Muñoz-Sanz et al., 2021).

L'IU dépendante des S-RNases utilise les mêmes acteurs et mécanismes que l'AIG ainsi que les gènes modificateurs *Cullin1*, *HT-A* et *HT-B* (Muñoz-Sanz et al., 2021, Qin et al., 2018).

Pour ce qui est de l'IU indépendante des S-RNases, elle a été découverte grâce à *Solanum pennellii* LA0716. Cette souche sans S-RNase fonctionnelle a été croisée sans succès avec du pollen de *S. lycopersicum*. Ce croisement non viable a suggéré l'existence d'une voie d'IU n'utilisant pas les S-RNases pour rejeter le pollen (Tovar-Mendez et al., 2014).

La voie indépendante des S-RNases contient plusieurs gènes qui sont exprimés soit dans le pistil, soit dans le pollen. Pour le pollen, *FPS2* (*FARNESYL PYROPHOSPHATE SYNTHASE*) est hautement exprimé chez *Solanum pennellii*. Son rôle serait de produire du farnésyl pyrophosphate nécessaire pour farnésyler les protéines de la membrane cellulaire. Une hypothèse propose qu'un potentiel facteur de résistance chez le pollen aurait besoin d'être farnésylé pour interagir avec une autre protéine du pistil (Qin et al., 2018).

Pour le pistil, 2 gènes seraient impliqués dans cette voie. Le premier, *ODC2*, code pour une ornithine décarboxylase. Cette enzyme est impliquée dans le métabolisme des polyamines et pourrait contribuer au rejet de pollen d'autres espèces. Le deuxième gène, *SpDIR1L* (*S. pennellii* *Defective in Induced Resistance 1-like*), code pour une protéine riche en cystéine. Chez *S. pennellii*, des observations sur des mutants perte de fonction pour ce gène montrent une IU beaucoup plus faible (Muñoz-Sanz et al., 2021). Toutefois, il est possible que les mécanismes moléculaires de l'IU diffèrent au sein du clade de la tomate car toutes les études se sont concentrées sur les acteurs de l'IU pour *S. pennellii*.

2.4 L'auto-compatibilité chez les espèces de tomates

L'AI n'est pas la règle générale dans le clade des tomates. 3 espèces dans le clade sont totalement incompatibles : *S. chilense*, *S. huaylasense*, *S. corneliomulleri*. A l'inverse, 6 espèces sont capables de s'auto-féconder : *S. cheesmaniae*, *S. chmielewskii*, *S. neorickii*, *S. galapagense*, *S. lycopersicum* et *S. pimpinellifolium* (Bedinger et al., 2011). L'AC ou l'AI d'une espèce n'est pas toujours totale non plus. Les 4 espèces restantes du clade (*S. arcanum*, *S. pennellii*, *S. habrochaites* et *S. peruvianum*) possèdent des populations AC et d'autres populations AI (Bedinger et al., 2011).

En théorie, la perte d'AI peut se produire lors d'une inactivation de la S-RNase via une mutation dans le S-locus. Cette mutation tronquera la protéine comme chez la tomate cultivée. L'AI peut s'inactiver aussi lors d'une pseudogénisation, d'une délétion du S-locus ou d'une duplication d'un S-locus permettant à une SLF d'un haplotype de dégrader la S-RNase de l'autre haplotype (Zhao et al., 2022). La S-RNase n'est pas le seul gène responsable d'une perte potentielle d'AI. Des mutations chez *HT-A* et *HT-B* peuvent tronquer leurs protéines et mener à l'AC chez les espèces du genre *Solanum* (Tovar-Mendez et al., 2014).

Même si ces mécanismes ne sont pas si fréquents, il n'est pas impossible de renverser le processus évolutif. Une mutation inverse ou une nouvelle insertion peut faire revenir l'AI dans les populations de l'espèce (Fuji et al., 2016).

Objectifs du mémoire

De nombreuses études sont menées au laboratoire GRPV sur la résistance aux stress salin, thermique et hydrique de *S. lycopersicum* L. (AC), *S. chilense* Dun. (AI) et leurs hybrides. Nous possédons une population de différents individus de *S. chilense* et une population d'hybrides issus du croisement entre une plante de *S. lycopersicum* et une plante de *S. chilense*. Durant ces travaux de recherche, des relations d'incompatibilité unilatérale ont été observées entre ces différentes espèces. A ce jour, l'incompatibilité unilatérale et son lien avec l'auto-incompatibilité sont des phénomènes mal compris dans le clade de la tomate. Par conséquent, il a été décidé, dans le cadre de ce mémoire, d'investiguer les mécanismes génétiques liés à l'auto-incompatibilité et à l'incompatibilité unilatérale entre *S. lycopersicum*, *S. chilense* et leurs hybrides.

Tout d'abord, les relations d'AI entre plantes et les S-allèles seront déterminés dans notre population de *S. chilense*. L'identification des S-allèles des différents individus de la population sera réalisée par amplification et séquençage des S-RNases et permettra de prédire les compatibilités entre individus. En parallèle, des croisements *S. chilense* x *S. chilense* seront réalisés pour confirmer les compatibilités prédites et vérifier si les relations entre S-allèles suivent les règles mendéliennes (croisements compatibles, semi-compatibles et incompatibles) ou si leur régulation est plus complexe chez *S. chilense*. Ces croisements ont également permis de prédire les S-allèles communs entre individus lorsque les croisements étaient incompatibles. De plus, la séquence de la S-RNase sera caractérisé à l'aide de différents outils bio-informatiques.

Concernant les hybrides, les résultats de Leclef (2021) suggéraient que les hybrides possèdent un mécanisme d'AI hérité par les S-allèles du parent mâle (*S. chilense*) et ont identifié les S-allèles de ce parent mâle. Dans ce mémoire, nous confirmerons si l'AI est présente chez les hybrides. Les S-allèles seront identifiés pour chaque individu de notre population d'hybrides et des croisements seront réalisés entre individus possédant les mêmes S-allèles et différant par leurs S-allèles et la croissance des tubes polliniques sera mesurée afin de confirmer si l'auto-incompatibilité des hybrides est gamétophytique ou non.

Pour l'incompatibilité unilatérale, des croisements entre les parents des hybrides (*S. lycopersicum* et *S. chilense*) seront réalisés en utilisant les deux comme parents mâles et femelles et la croissance des tubes polliniques sera mesurée pour comprendre si les mécanismes de rejet du pollen sont différents ou non de l'auto-incompatibilité. Ensuite, plusieurs rétrocroisements entre les hybrides et leurs parents permettront de savoir si l'IU existe chez les hybrides. La croissance des tubes polliniques des rétrocroisements sera mesurée pour déterminer le niveau du rejet des tubes polliniques pour les croisements non compatibles.

Pour finir, les homologues du gène *SpDIR1L* (récemment identifié comme intervenant dans l'IU chez *S. pennellii*, Muñoz-Sanz et al., 2021) seront recherchés chez *S. lycopersicum* et *S. chilense* et leur expression sera étudiée dans les organes reproducteurs mâles et femelles de *S. lycopersicum*, de *S. chilense* et de leurs hybrides afin de voir si ce gène interviendrait également dans l'IU chez ces espèces.

Matériel et méthodes

Matériel végétal et conditions de culture :

Deux espèces végétales ont été cultivées pour cette étude : la tomate cultivée (*Solanum lycopersicum* cv. Ailsa Craig, accession LA2838A) et *Solanum chilense* (accession LA4107). Les graines de la tomate cultivée ont été fournies par le TGRC (Tomato Genetics Resource Center, UC Davis, USA) et celles de *S. chilense* par le Dr Martinez (INIA-La Cruz, Chili) et elles ont ensuite été multipliées au laboratoire. A partir de ces deux espèces, des hybrides ont été formés en croisant manuellement le pollen d'une plante de *S. chilense* (nommée SC2) avec la partie femelle de *S. lycopersicum* cv. Ailsa Craig.

Ainsi nous disposions pour le mémoire de 20 plantes de *S. chilense* et de 20 plantes d'hybrides qui ont été maintenues tout au long du mémoire et multipliées par bouturage. Etant donné que *S. lycopersicum* cv. Ailsa Craig se multiplie par autopolinisation et que les plantes sont génétiquement identiques, différents semis ont été réalisés au cours du mémoire en fonction des besoins.

La culture des plantes s'est faite dans les serres de Louvain-la-Neuve (16h de photopériode, température jour/nuite de $25,8^{\circ}\text{C} \pm 2,34$ / $22,2^{\circ}\text{C} \pm 1,93$, humidité relative moyenne de $57\% \pm 0,095$).

Croisements

2 types de croisements ont été effectués :

Croisement *S. chilense* x *S. chilense*.

Pour déterminer la compatibilité entre les plantes de *S. chilense* et comprendre les relations entre S-haplotypes et AI, des croisements ont été réalisés entre les différents individus de *S. chilense*. Le croisement se fait manuellement sur des fleurs en anthèse. Le pollen d'une fleur de la plante utilisée comme parent mâle est récolté à l'aide d'une aiguille montée et est déposé sur le stigmate d'une fleur de la plante utilisée comme parent femelle. Chaque fleur pollinisée est identifiée par une étiquette indiquant le croisement réalisé. Toutes les fleurs en anthèse d'une même inflorescence sont pollinisées avec le même pollen et les fleurs non ouvertes ou fanées sont retirées. En moyenne 10 fleurs sont pollinisées par type de croisement.

Rétrocroisement hybride x parent.

Pour comprendre la compatibilité des hybrides avec leurs parents et déterminer l'existence de l'IU chez les hybrides, des rétrocroisements ont été faits entre les hybrides et leurs parents. Pour les croisements avec *S. chilense* (SC2) et les hybrides comme parents femelles, le croisement se fait manuellement lors de l'anthèse de la fleur comme décrit précédemment. Pour les croisements avec *S. lycopersicum* comme parent femelle, une émasculatation des anthères avant l'anthèse a été réalisée pour éviter l'autopolinisation. Pour tous les croisements, le pollen est récolté à l'aide d'une aiguille lancéolée pour être déposé sur le stigmate de la femelle. Toutes les fleurs en anthèse d'une même inflorescence sont pollinisées avec le même pollen et les fleurs non ouvertes ou fanées sont retirées. En moyenne 10 fleurs sont pollinisées par type de croisement.

Entre chaque croisement, l'aiguille est désinfectée avec de l'éthanol 70% pour éviter toute contamination de pollen non désiré.

Le succès des croisements est évalué en calculant le taux de mise à fruit (pourcentage du nombre de fruits par nombre de fleurs pollinisés). Lorsque le fruit arrive à maturité, les graines sont

récoltées et comptées (après agitation pendant quelques heures dans du Na_2CO_3 10% pour retirer le gel entourant les graines).

Étude histologique des barrières pré-zygotiques des croisements intra et interspécifiques pour *Solanum lycopersicum*, *Solanum chilense* et leurs hybrides

L'étude des barrières prézygotiques à la reproduction nécessite de déterminer l'effet de l'AI et de l'IU sur la germination du pollen et la croissance des tubes polliniques. Par conséquent, les barrières pré-zygotiques ont été investiguées pour les croisements entre *Solanum lycopersicum*, *Solanum chilense* (SC2) et leurs hybrides. Toutes les combinaisons de croisements intraspécifiques et interspécifiques ont été testées avec un minimum de 5 réplicats.

Avant chaque croisement, les fleurs sont émasculées avant l'anthèse à l'aide d'une pince pour éviter une autopolinisation de la fleur. Dès que la fleur est émasculée, le pollen du parent mâle est directement déposé sur le stigmate de la fleur avec une aiguille montée comme expliqué précédemment et une seconde pollinisation est effectuée deux jours plus tard pour renforcer la qualité du croisement. Quatre jours après l'émasculature, les fleurs sont récoltées et stockées dans du FAA (90% d'éthanol 70%, 5% d'acide acétique glacial et 5% de formaldéhyde 5%).

Avant observation au microscope, les fleurs sont baignées dans une solution de NaOH 0,1 M pendant 6 à 12h pour ramollir les tissus. Ensuite elles sont rincées dans l'eau et, à l'aide d'une pince, le pistil est extrait du reste de la structure reproductrice ; après quoi le pistil est rincé successivement 3 fois à l'eau avant d'être monté entre lame et lamelle dans 10 μl de bleu d'aniline (0,1 g de bleu d'aniline + 0,87 g de KH_2PO_4 dans 100 ml d'eau, pH 9) et légèrement écrasé afin de voir les tubes polliniques. Les lames sont alors observées au microscope à fluorescence (Polyvar, Reichert, filtre d'excitation BP330-380, filtre d'arrêt LP418) ; le pollen et les tubes polliniques prenant une coloration fluorescente bleue au microscope.

Lors de l'observation des différentes coupes, le taux de germination du pollen est évalué en comptant le nombre de grains de pollen germés sur le nombre de grains de pollen totaux. La croissance des tubes polliniques est déterminée aussi en regardant le nombre de tubes polliniques présent au premier, deuxième ou troisième tiers du style.

Identification des S-RNases chez *S. chilense*

Pour identifier les S-allèles de *S. chilense* dans la population du laboratoire, 40 à 60 pistils ont été récoltés pour cinq individus. Tous les pistils ont été plongés dans de l'azote liquide et conservés à -80°C .

L'ARN est extrait avec du Tripure isolation reagent (Roche) selon le protocole du fabricant. Tous les pistils venant d'un même individu sont broyés ensemble dans de l'azote liquide. 100 mg de chaque broyat est transféré dans un tube Eppendorf de 2 ml auquel s'ajoute 1 ml de Tripure. Après un passage au vortex, les échantillons sont incubés pendant 5 minutes à température ambiante pour que le Tripure puisse lyser les cellules. 0,2 ml de chloroforme sont ajoutés à chaque échantillon pour séparer les protéines du reste de la phase. Les tubes Eppendorf sont secoués vigoureusement pendant 15 secondes et sont incubés pendant 15 minutes à température ambiante. Lorsque l'incubation est finie, les échantillons sont centrifugés à 12 000 g pendant 15 minutes à 4°C pour séparer les phases. La phase aqueuse de chaque échantillon est prélevée pour être mise dans un tube Eppendorf de 1,5 ml en y ajoutant 0,5 ml d'isopropanol. Après mélange par inversions des tubes et 5 à 10 minutes d'incubation à température ambiante, les tubes sont centrifugés pendant 10 minutes à 4°C . Le surnageant est évacué et le culot est lavé avec 1 ml d'éthanol 75 % RNase free (RF) glacial par passage au vortex et à la centrifugeuse à 7500 g durant 5 minutes à 4°C . Finalement le surnageant est éliminé, le culot est séché et l'ARN purifié est suspendu dans 20 μl d'eau traité au diethylpyrocarbonate (DEPC).

Une dernière incubation à 55-60°C pendant 10 minutes a permis une meilleure dissolution des échantillons.

Une fois l'ARN extrait, les concentrations et la pureté des échantillons sont mesurées à l'aide du spectrophotomètre NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Villebon-sur-Yvette, France).

Un traitement à la DNase a été réalisé avec le kit RQ1 Rnase-free Dnase (Promega, 2800 Woods Hollow Road, États-Unis) : 5 µl de tampon 10X, 5 µl de DNase et 20 µl d'eau DEPC ont été ajoutés à la solution de 20 µl d'ARN. 10 µl d'acétate de sodium RF 3M à pH 5,8 et 200 µl d'éthanol 75% RF glacial sont ajoutés dans chaque tube Eppendorf. Une incubation d'une nuit à -20°C et 20 minutes de centrifugation à 11 000g à 4°C ont permis de reprécipiter chaque échantillon d'ARN. A la fin du traitement, le surnageant est éliminé. Chaque culot est rincé à l'éthanol 75% RF glacial pour être vortexé et centrifugé pendant 5 minutes à 7500g. Le surnageant est éliminé. Les tubes Eppendorf sont recentrifugés rapidement. Le culot est séché et les échantillons sont dilués dans 20 µl d'eau DEPC. Une deuxième mesure au spectrophotomètre NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Villebon-sur-Yvette, France) a permis d'attester de la pureté des échantillons d'ARN (ratio 260/280nm ~2, ratio 260/230 nm 1,8-2,2) et de quantifier la concentration finale.

Chaque échantillon d'ARN est rétrotranscrit en cDNA selon 2 méthodes : RACE (3'rapid amplification of cDNA ends) et oligo-dT. La méthode RACE utilise une amorce RaceA (Tableau 1) contenant une queue poly-T et une séquence complémentaire à toutes les S-RNases. RaceA permet de transformer en cDNA tous les ARN messagers transcrits possédant la séquence complémentaire à toutes les S-RNases. Après la rétrotranscription, les amorces RaceB (Tableau 1) (complémentaire à RaceA) et PR1 (Tableau 1) (complémentaire à la 2^{ème} région conservée des S-RNases C2) seront utilisés pour amplifier spécifiquement par PCR les cDNA des S-RNases. Cette technique permet d'amplifier la séquence de la S-RNases de la région C2 jusqu'à la fin de la séquence. La méthode oligo-dT consiste à rétrotranscrire de manière non spécifique tous les ARN messagers contenant une queue poly-A. Dans ce but, une amorce oligo-(dT)₁₈ est utilisée en raison de sa queue poly-T dans sa séquence.

La transformation d'ARN en cDNA par la méthode RACE est réalisée selon l'article de Igic et al. (2007). Pour cette méthode, le kit RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis kit (ThermoFisher, 168 3rd Avenue, Waltham, Massachusetts, États-Unis) a été utilisé. 100 ng de chaque échantillon d'ARN a été prélevé pour être mis dans un tube PCR de 0,5 ml. En fonction de la concentration de l'échantillon d'ARN, le volume restant est complété par de l'eau DEPC milliQ pour arriver à 11 µl dans chaque tube. 2 µl d'amorce RaceA (10 µM) est déposée dans chaque échantillon. Après un passage à 65°C pendant 5 min, les échantillons sont disposés dans la glace. Chaque tube reçoit un mélange composé de : (1) 4 µl de tampon (x5), (2) Ribolock RNase inhibitor (20 unités/µl), (3) 1 µl de dNTP (10 mM) et (4) 1 µl de ReverseAid H minus M-MuLV RT (200 unités/µl). Les échantillons sont ensuite incubés à 42°C pendant 1 heure puis à 70°C pendant 15 minutes. Lorsque la synthèse de cDNA est terminée, les échantillons de cDNA sont amplifiés par PCR. Pour l'amplification, un mélange contenant 1 µl d'amorce PR1 (10 µM), 1 µl Race B (10 µM), 1 µl de dNTP (10 mM), 0,25 µl de Go Taq polymérase (Go Taq G2 DNA Polymerase, Promega 3800 Woods Hollow Road, Madison, WI, USA), 34,75 µl d'eau milliQ et 10 µl de tampon (x5) est déposé dans des nouveaux tubes PCR de 0,5ml. En plus du mélange, 2 µl de cDNA de l'échantillon est ajouté. Pour l'amplification des échantillons de cDNA, la PCR a consisté en 3 minutes de dénaturation initiale à 94°C, 35 cycles composés de 30 secondes de dénaturation à 94°C, 30 secondes d'hybridation à 42°C et 1 minute d'élongation à 72°C, et finalement une élongation à 72°C pendant 12 minutes. L'amplification a été visualisée par électrophorèse (15 µl d'échantillon PCR, gel d'agarose à 1,8%).

La synthèse de cDNA avec l'amorce oligo-dT a été réalisée avec le même le kit RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis kit et le même protocole mais à partir de 300 ng d'ARN de chaque échantillon et en utilisant 0,5 µL d'oligo-dT pour chaque tube. Afin de vérifier si les cDNA sont bien rétrotranscrits, une PCR est réalisée sur chacun des échantillons avec un gène contrôle (*LeEF1alpha*, GenBank: X14449.1). Un mélange de (1) 0,5 µl d'amorce Forward de *LeEF1alpha* (10 µM), (2) 0,5 µl d'amorce Reverse de *LeEF1alpha* (10 µM), (3) 5 µl de tampon (5x), (4) 0,5 µl de dNTP (10 mM), (5) de 0,125 µl de Go Taq polymérase (Go Taq G2 DNA Polymerase, Promega 3800 Woods Hollow Road, Madison, WI, USA) et (6) 17,875 µl d'eau milliQ est mis dans un tube PCR de 0,5 ml pour chaque échantillon. Ensuite, 1 µl de cDNA est ajouté dans les tubes PCR. Les conditions de la PCR étaient : 3 minutes de dénaturation initiale à 94°C, 35 cycles composés de 30 sec de dénaturation à 94°C, 30 secondes d'hybridation à 60°C et 1 minute d'élongation à 72°C et une élongation finale à 72°C pendant 12 minutes. L'amplification a été visualisée par électrophorèse (15 µl d'échantillon PCR, gel d'agarose à 1,8%).

À la suite des échecs de la méthode RACE, deux autres méthodes ont été testées pour amplifier les S-RNases. La première méthode est une amplification du cDNA (méthode oligo-dT) par PCR en utilisant des amorces dégénérées de régions conservées aux S-RNases basées sur l'article de Richman et al. (1995). Les deux amorces forward PR0 et PR1 ont été créés à partir de la région conservée C1 et C2 des S-RNases. Pour les amorces reverse PR2 et PR3, ce sont les régions conservées C3 et C4 des S-RNases (Tableau 1). La deuxième méthode est tirée de l'article de Kondo et al. (2002). Il s'agit d'une amplification de l'ADN génomique de *S. chilense* par PCR emboîtée (Figure 11) (Özgür Çakır., 2016). Une première PCR est faite avec des amorces externes LP5A et LP3A des S-RNases (Tableau 1). Ensuite, une deuxième PCR est faite en utilisant cette fois-ci des amorces internes LP5B et LP3B basés sur les régions conservées C2 et C5 pour amplifier plus précisément la région contenant la séquence des S-RNases.

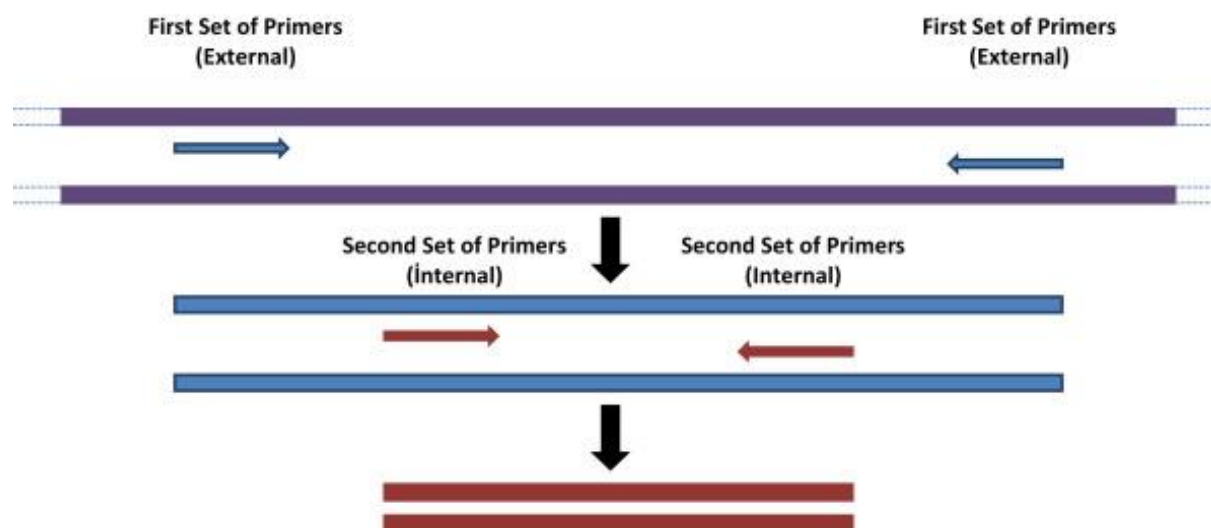


Figure 11 : Représentation schématique d'une PCR emboîtée. Mauve = séquence d'ADN amplifiable lors de la première PCR en utilisant les amorces externes. Bleu = séquence d'ADN amplifiable lors de la deuxième PCR en utilisant les amorces internes. Rouge = séquence d'ADN amplifié à l'aide des amorces internes et externes (Özgür Çakır., 2016).

Afin d'amplifier le cDNA (oligo-dT) de nos échantillons par PCR, un mélange de (1) 0,5 µl d'amorces Forward PR0 ou PR1 (10 µM) (2) 0,5 µl d'amorce Reverse PR2 ou PR3 (10 µM) (3) 5 µl de tampon (5x), (4) 0,5 µl de dNTP (10 mM), (5) de 0,125 µl de Go Taq G2 DNA

Polymerase et (6) 17,875 µl d'eau milliQ est mis dans un tube PCR de 0,5 ml pour chaque échantillon. Ensuite, 1 µl de chaque échantillon de cDNA (oligo-dT) a été ajouté. Au total, chaque échantillon de cDNA a été testé avec 4 combinaisons différentes d'amorces forward ou reverse. Pour la PCR, les conditions étaient de 5 minutes de dénaturation initiale à 94°C, 38 cycles composé de 30 secondes de dénaturation à 94°C, 45 secondes d'hybridation à 45°C et 1 minute 5 secondes d'élongation à 72°C et une élongation finale à 72°C pendant 10 minutes. Suite à de nombreuses tentatives, plusieurs paramètres de la méthode ont varié au cours des essais. Le cDNA a notamment été testé avec un facteur 5 de dilution, les cycles de la PCR ont été modifiés (35 cycles, 30 secondes de dénaturation, 2 minutes d'hybridation, 1 minute 30 secondes d'élongation). Une autre variante a tenté de reprendre 1 µl de la PCR initiale comme base de cDNA et faire une PCR de 35 cycles (30 secondes de dénaturation à 94°C, 45 secondes d'hybridation à 55°C et 1 minute 5 secondes d'élongation à 72°C).

Concernant la deuxième méthode, l'amplification de l'ADN génomique par PCR emboîtée a nécessité des échantillons de 0,1 µg d'ADN provenant d'extractions d'ADN précédentes sur *Solanum chilense*. Un mélange de (1) 0,5 µl d'amorces Forward LP5A (10 µM) (2) 0,5 µl d'amorces Reverse LP3A (10 µM) (3) 5 µl de tampon (5x), (4) 0,5 µl de dNTP (10 mM), (5) de 0,125 µl de Go Taq polymérase (Go Taq G2 DNA Polymerase, Promega 3800 Woods Hollow Road, Madison, WI, USA) et (6) 17,875 µl d'eau milliQ est mis dans un tube PCR de 0,5 ml pour chaque échantillon d'ADN. Ensuite, les échantillons d'ADN sont dilués 10x et ajoutés chacun d'un des tubes PCR. Pour la première PCR, les conditions sont les suivantes : 1 minute à 95°C de dénaturation initiale, 30 cycles (contenant 1 minute de dénaturation à 95°C, une hybridation à 50°C pendant 1 minute et une élongation de 1 minute à 72°C) et une élongation finale à 72°C pendant 4 minutes. Après la première PCR, un mélange quasiment similaire à la première PCR est mis dans de nouveaux tubes à PCR 0,5 ml. Les amorces externes LP5A et LP3A sont remplacés par les amorces internes LP5B et LP3B dans le mélange. Pour finir, la 2^{ème} PCR est réalisée dans les mêmes durées et températures que la 1^{ère} PCR.

Pour les deux dernières méthodes, 15 µl de chaque échantillon était déposé sur un gel d'agarose à 1,8% avec du bromure d'éthidium pour vérifier si l'amplification était faite ou non.

Tableau 1 : Amorces utilisées pour l'identification des S-allèles de *S. chilense*.

Nom de l'amorce	Séquence (5'- 3')	Sens	Température d'hybridation
Race A	GCGCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTT	R	48°C
Race B	GCGCACGCGTCGACTAGTAC	R	48°C
PR 0	CARCTNGTHTTVMVWTGGCC	F	60°C
PR 1	GAATTCA YGGNYTNTGGCCNGA	F	60°C
PR 2	NNAAGCTTTCTRHACWACASGTTCCATGCTT	R	60°C
PR 3	NNGTCGACRAAACATATNCCTAYYTCNHNTAGYTC	R	60°C
LeEF1alpha	GACAGGCGTTCAGGTAAGGA	F	60°C
LeEF1alpha	GGGTATTCAGCAAAGGTCTC	R	60°C
LP5A	AAYTTYAAVATHCAY	F	50°C
LP3A	GGTYDARACATATDCC	R	50°C
LP5B	ATHCAYGGSSTDTGGCCD	F	50°C

LP3B	ATATDCCWAYYTCMDDWAGTTCAA	R	50°C
-------------	---------------------------------	----------	-------------

Identification et répartition des S-allèles des hybrides

Une étude antérieure réalisée au laboratoire a permis d'identifier par séquençage les S-allèles de *Solanum chilense* (SC2) qui a servi de parent mâle pour l'obtention des hybrides. SC2 possède les allèles *S10* et *S16* (*S16/SP13 S. peruvianum*) (Moreels., 2022). Afin d'identifier les S-allèles des hybrides du laboratoire ainsi que la répartition de ces allèles dans la population, des amorces spécifiques à *S10* et *S16* ont été dessinés en alignant plusieurs réplicats de séquence de *S10* et *S16*. De ces alignements, une séquence consensus a été utilisée pour dessiner des amorces sur Primer3Plus (Untergasser et al. 2007). L'ADN de chaque hybride de la population a été extrait pour amplifier par PCR soit le S-allèle *S10*, soit le *S16*.

L'extraction d'ADN a été réalisée selon Fulton et al. (1995) à partir de 3 à 4 folioles de chaque individu. Après broyage à l'azote liquide, le broyat est mis dans un tube Eppendorf de 1,5 ml pour être homogénéisé dans 750 µl de micro prep buffer (0,02 g de Na bisulfite, 125 µl de sarkosyl 5%, 312,5 µl de nuclei lysis buffer et 312,5 µl d'extraction buffer (Tableau 2 et 3). Après une incubation à 65°C pendant 45 minutes, 750 µl de chloroforme/alcool isoamylique (24 :1) sont ajoutés et les tubes sont inversés plusieurs fois. Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 5 minutes à 10 000 rpm pour séparer la phase organique de la phase aqueuse contenant l'ADN. Chaque phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube Eppendorf 1,5 ml. 600 µl d'isopropanol est ajouté à chaque échantillon et les tubes sont inversés pour faire précipiter l'ADN. Afin d'améliorer la précipitation d'ADN, les échantillons sont centrifugés 5 minutes à 10 000 rpm et le surnageant est éliminé des tubes. Une fois le culot formé, un lavage à l'éthanol 70% est fait. Les culots d'ADN sont séchés pendant 30 à 60 minutes et resuspendus dans 50 µl d'eau milliQ. Une centrifugation de 10 minutes à 10 000 rpm a permis d'avoir un ADN plus pur en précipitant l'amidon.

Afin d'amplifier les S-allèles des hybrides, un mélange de (1) 0,5 µl d'amorce Forward *S10* ou *S16* (10 µM), (Tableau 4) (2) 0,5 µl d'amorce Reverse *S10* ou *S16* (10 µM) (Tableau 2), (3) 5 µl de tampon (5x), (4) 0,5 µl de dNTP (10 mM), (5) de 0,125 µl de Go Taq polymérase (Go Taq G2 DNA Polymerase, Promega 3800 Woods Hollow Road, Madison, WI, USA) et (6) 17,875 µl d'eau milliQ est mis dans un tube PCR de 0,5 ml pour chaque échantillon d'hybride testé. Chaque échantillon d'hybride (1 µl d'ADN) est testé avec les 2 combinaisons d'amorces de S-allèles. La PCR est réalisée selon les durées suivantes : 3 minutes à 94°C de dénaturation initiale, 33 cycles (contenant 30 secondes de dénaturation à 94°C, une hybridation à 56°C pendant 30 secondes et une élongation de 30 secondes à 72°C) et une élongation finale à 72°C pendant 10 minutes. Finalement, chaque échantillon est déposé sur un gel d'agarose à 1,8% avec du bromure d'éthidium pour identifier le S-allèle de l'hybride.

Tableau 2 : Description des réactif utilisé pour le Nuclei lysis buffer.

Réactif	Concentration
Tris	0,2 M
EDTA-Na₂	0,05 M
NaCl	2 M
CTAB	2 g/100 ml

Tableau 3 Description des réactifs utilisés pour le DNA extraction buffer.

Réactif	Concentration
Sorbitol	0,35 M
Tris-base	0,1 M
NaCl	5 mM
Nabisulfite	0,02 M

Tableau 4 Amorces utilisées pour l'identification des S-allèles des hybrides.

Nom de l'amorce	Séquence (5'- 3')	Sens	Température d'hybridation
S10	GACCTTTTGACAACTCTCCGG	F	56°C
S10	CCCGATGCAACAAAGGTGAT	R	56°C
S16	ACGCAATCATGACCGTTACG	F	56°C
S16	TGCTTTCAATTGACCTCGGC	R	56°C

Étude de l'expression du gène *DIR1L* par RT-qPCR

Afin de voir si le gène *DIR1L* interviendrait dans l'incompatibilité unilatérale chez *S. chilense* comme cela a été suggéré pour *S. pennellii* (Munoz-Sanz et al., 2021), son expression a été comparée dans les étamines et le pistil de *S. lycopersicum*, *S. chilense* et leurs hybrides.

La séquence du gène *DIR1L* de *Solanum chilense* ainsi que ses homologues ont été récupérés sur le site du NCBI (National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) et du SGN (Solanaceae Genomics Network, <https://solgenomics.net/>). L'ensemble des séquences ont été alignées sur Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Ensuite, les amorces ont été dessinées sur Primer3Plus (Untergasser et al. 2007) (Tableau 5).

L'amplification des transcrits de *DIR1L* a été réalisée à partir des échantillons de cDNA obtenus via la rétrotranscription par la méthode oligo-dT. L'expression de *DIR1L* a été étudiée par qPCR en utilisant les gènes *LeEF1-α* (Elongation factor 1-alpha, Solyc06g005060) et *TIP41* (TIP41-like protein, Solyc10g049850) comme gènes de référence ; ceux-ci ont été choisis en raison de leur qualité en tant que gène contrôle (Asins et al., 2013, Leelatanawit et al. 2017). Les qPCR ont été réalisées en triplicats avec le kit GoTaq qPCR Master Mix (Promega, 2800 Woods Hollow Road, États-Unis). Les amorces utilisées sont reprises dans le Tableau 5. Pour chaque échantillon et gène, un mélange de (1) 5 µl de Sybr Green, (2) 0,4 µl d'amorce forward (10 µM), (3) 0,4 µl d'amorce reverse (10 µM), (4) 0,1 µl de CRX, (5) 2,3 µl d'eau nuclease-free et (6) 2 µl de cDNA est versé dans un puit d'une plaque qPCR (MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction plate with bar code, Life Technologies Corporation 5781 Van Allen Way Carlsbad, CA 92008). Une fois que la plaque est prête à être analysée, un film (MicroAmp Optical Adhesive Film Kit, Life Technologies Corporation 5781 Van Allen Way Carlsbad, CA 92008) est mis sur la plaque. Les échantillons sont mis dans une machine à qPCR (StepOnePlus Real-Time PCR systems (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) pour être amplifiés. Les conditions de la qPCR étaient les suivantes : 10 minutes de dénaturation à 95°C, 40 cycles de 15 secondes à 95°C et 1 seconde à 60°C. Les résultats des échantillons sont analysés à l'aide du logiciel StepOne 2.3. Les melting-curves sont aussi regardées pour détecter la présence d'amplifications anormales d'échantillon d'ADN, de cDNA, ...

Avant amplification des échantillons d'intérêt, une droite de calibration est réalisée à partir d'un pool de cDNA afin de vérifier l'efficacité des différents couples d'amorces. Ce pool sera successivement dilué d'un facteur 5 trois fois et mesuré lui aussi en triplicats. Les mêmes kits, matériel et conditions ont été utilisés pour l'amplification. Pour calculer l'efficacité d'amplification, chaque cycle CT de pool est mis sur une échelle logarithmique en fonction de la concentration. Selon la courbe formée, une régression linéaire est générée et l'efficacité d'amplification est calculée selon l'équation suivante :

$$Efficacité = -1 + 10^{-1/pente} \text{ (Équation 1)}$$

Une fois l'efficacité mesurée, la quantité d'ARN de chaque échantillon d'intérêt et des gènes d'intérêts est mesurée à l'aide de leur CT respectif selon une deuxième équation :

$$\frac{CT-b}{a} = y \text{ (Équation 2)}$$

Dans l'équation 2, y est l'inconnue, a la pente et b l'ordonnée à l'origine de la régression linéaire de l'efficacité du gène mesuré.

Lorsque l'inconnue y est déterminée, la quantité d'ARN du gène d'intérêt et de référence peut être calculée selon la formule :

$$10^y = \text{quantité d'ARN exprimée} \text{ (Équation 3)}$$

Une fois que la quantité d'ARN est calculée pour chaque échantillon, le gène candidat est normalisé à l'aide des deux autres gènes de référence.

$$\frac{\frac{ARN_{G\grave{e}ne\ candidate}}{ARN_{G\grave{e}ne\ r\acute{e}f\acute{e}rence\ 1}} + \frac{ARN_{G\grave{e}ne\ candidate}}{ARN_{G\grave{e}ne\ r\acute{e}f\acute{e}rence\ 2}}}{2} = \text{Quantité d'ARN normalisée} \text{ (Équation 4)}$$

A la fin de l'analyse, l'expression des échantillons normalisés est standardisée grâce à une valeur référence déterminée. L'expression des pistils de *S. lycopersicum* normalisé a été choisi comme référence car pour *DIR1L*, la question initiale était de comprendre son expression dans le pistil.

$$\frac{\text{Quantité d'ARN normalisée}}{\text{Quantité d'ARN normalisée référence}} = \text{Quantité d'ARN standardisée} \text{ (Équation 5)}$$

Lorsque les données sont comparées aux pistils de *S. lycopersicum*, un histogramme en unités arbitraires est établi avec chacune des quantités d'ARN standardisées et la valeur référence de l'histogramme. Les melting-curves sont aussi regardées dans l'analyse pour détecter la présence d'amplifications anormales d'échantillon d'ADN, de cDNA, ...

Tableau 5 : Amorces utilisées pour l'identification et la quantification d'expression d'ARN de *DIR1L*.

Nom de l'amorce	Séquence (5' - 3')	Sens	Température d'hybridation
DIR1L	TTGGTTATAGTTGCAGCCATTGG	F	56°C
DIR1L	TTTGGTTAAAGCAGCACAACA	R	56°C
LeEF1alpha	GACAGGCGTTCAGGTAAGGA	F	60°C
LeEF1alpha	GGGTATTCAGCAAAGGTCTC	R	60°C
TIP41	CGAAAGCAATGTGCGAGTGTG	F	60°C
TIP41	GGTTCCTTTAGACGCCAATGC	R	60°C

Analyse bio-informatique des *S-RNases* et de *DIR1L*

Plusieurs arbres phylogénétiques ont été générés à partir des séquences des *S-RNases* et de *DIR1L*. Un premier arbre a été formé pour comparer la séquence de *DIR1L* au sein du clade *Lycopersicum* et vérifier le nombre de copies du gène chez *S. chilense*. Un deuxième arbre a essayé de comprendre l'histoire évolutive des *S-RNases* chez *S. chilense*. La formation de ces arbres a nécessité la récupération des séquences nucléotidiques homologues par BLAST sur le site du NCBI (National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) et du SGN (Solanaceae Genomics Network, <https://solgenomics.net/>).

Une fois les séquences nucléotidiques récupérées en fichier fasta, un alignement est fait sur Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) avec le format fasta de chacune des séquences. En fonction de la qualité de l'alignement obtenu, deux options sont possibles : (1) l'alignement a une haute similarité globale, aucune modification n'est à faire, (2) l'alignement a des hautes similarités locales, les séquences peu conservées de l'alignement doivent alors être supprimées. Les modifications des alignements étaient faites sur Jalview (Version 2.11.2.5, <http://www.jalview.org/getdown/release/>).

La construction des arbres phylogénétiques s'est faite sur phylogeny.fr (<http://www.phylogeny.fr/>). Les arbres ont été générés par maximum de vraisemblance avec le programme PhyML (version 3.1/3.0 aLRT). Le maximum de vraisemblance a été choisi car c'est une méthode probabiliste utilisable lorsque le nombre de caractères dans la séquence est supérieur à la moitié du nombre de séquences à analyser. De plus, le degré d'évolution entre les différentes séquences n'est pas encore connu. La visualisation des arbres a été faite via TreeDyn (version 198.3).

Chez *S. chilense*, peu de données existent sur la biochimie de la *S-RNase*. Il a donc été décidé à l'aide de plusieurs outils bio-informatiques de chercher à comprendre la structure de la protéine, ses sites catalytiques et son optimum d'activité. En se basant sur les alignements de Clustal Omega des *S-RNases* de *S. chilense*, le site Weblogo 3 (<https://weblogo.threeplusone.com/create.cgi>) a permis d'illustrer les propriétés acido-basiques, l'hydrophobicité et la conservation des acides aminés pour l'ensemble des *S-RNases* de *S. chilense*. Pour les sites catalytiques, le site Interpro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) a permis de situer la région catalytique des *S-RNases* à partir de la séquence nucléotidique d'une des *S-RNases* de *S. chilense*. Concernant la structure tridimensionnelle, la séquence d'acides aminés a été envoyée à la protein data bank (PDB, <https://www.rcsb.org/>) et sur Alphafold (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>) pour essayer de trouver la structure 3D la plus représentative possible. L'annotation de la structure 3D s'est faite sur PyMol (version 2.5, <https://pymol.org/2/>).

Analyse statistique

Des analyses statistiques ont été menées sur le logiciel R (4.2.2). Un test ANOVA2 et le test de Tukey ont été utilisés pour déterminer les différences d'expression d'ARN entre les espèces et les organes reproducteurs. Pour les croissances des tubes polliniques, des GLMs, des tests Chi² et des comparaisons 2 à 2 ont été faits. L'objectif était de savoir si le pourcentage de tubes polliniques en croissance différait d'un croisement à un autre. Différents graphes ont été réalisés à l'aide du logiciel Excel (Version 16.0).

Résultats

Partie 1 : Auto-incompatibilité

A - Les S-RNases chez *Solanum chilense*

Identification des S-RNases dans la population de *S. chilense*

Afin d'identifier les croisements compatibles au sein de notre population de *S. chilense*, nous avons tout d'abord tenté d'amplifier et de séquencer les S-RNases des individus pour lesquels celles-ci n'étaient pas connues.

L'ARN des pistils de 5 plantes de *S. chilense* (SC2, PIS14, PIS31, PIS34 et PIS36) a été extrait afin de confirmer les allèles d'auto-incompatibilité de SC2 et d'identifier ceux non connus des 4 autres plantes en utilisant la méthode RACE (3'-rapid amplification of cDNA ends) selon Igic et al. (2007). Aucune amplification n'a été obtenue pour les plantes d'intérêt (Figure 12) : sur le gel de la PCR, seul le contrôle positif a révélé une bande d'amplification fluorescente. Malgré la présence d'ARN dans les échantillons, la transformation des ARN en cDNA et l'amplification des S-RNases par la méthode RACE n'a donné aucun échantillon fiable susceptible d'être cloné, puis séquencé.



Figure 12 : Gel des échantillons PCR amplifiés par la méthode RACE à partir des ARN des plantes de *S. chilense* (SC2, PIS14, PIS 31, PIS 34, PIS 36 et un contrôle positif (C+). Le contrôle positif est un ancien échantillon d'ARN de *S. chilense* pour lequel une amplification a été obtenue précédemment par la méthode RACE.

Afin de vérifier la qualité de notre ARN et de s'assurer que la synthèse de cDNA était possible, nous avons synthétisé du cDNA avec une amorce oligo-dT et amplifié un gène contrôle (*LeEF1alpha*, GenBank : X14449) pour les 5 ARNs de pistils et pour 5 ARNs extraits des étamines des mêmes 5 plantes. Sur le gel (Figure 13), l'amplification du gène contrôle *LeEF1alpha* montre que la rétrotranscription s'est faite pour presque tous les organes sexuels des 5 plantes *S. chilense*. La bande d'amplification était plus forte pour les étamines que pour les pistils, en raison d'une plus grande quantité d'ARN extraite pour les étamines que pour les pistils. Des nouveaux échantillons de cDNA ont été refaits pour les pistils de PIS14 et PIS34 car l'amplification n'était pas suffisante lors de la première rétrotranscription.

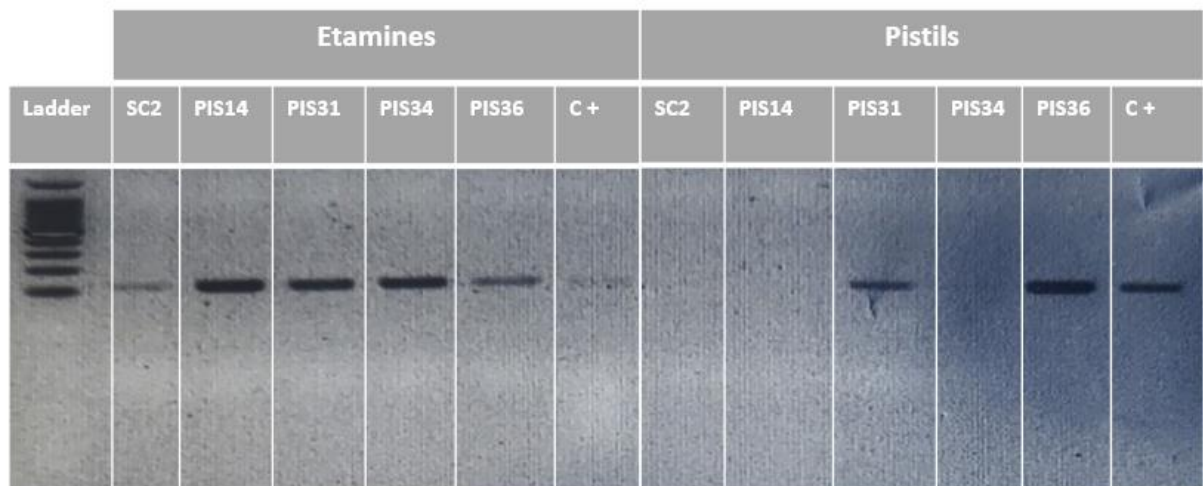


Figure 13 : Gel des échantillons PCR convertis en cDNA par la méthode oligo-dT sur les cDNAs des étamines et des pistils de *S. chilense* (SC2), PIS14, PIS 31, PIS 34, PIS 36 et un contrôle positif (C+). Le contrôle positif est un échantillon de cDNA de *Solanum lycopersicum*. Le gène contrôle amplifié pour tester la rétrotranscription par oligo-dT est LeEF1alpha.

Puisque du cDNA a été obtenu avec les oligo-dT, des échantillons de pistil ont été utilisés pour essayer d'amplifier les S-allèles inconnus et ce, sur base de la méthode de Richman et al. (1995). Cette méthode a pour but d'amplifier les S-RNases avec différentes combinaisons d'amorces Forward (PR0 et PR1 créées respectivement à partir des régions conservées C1 et C2 des S-RNases) et Reverse (PR2 et PR3 créées respectivement à partir des régions conservées C3 et C4 des S-RNases). Au total, 4 combinaisons d'amorces ont été utilisées pour amplifier les cDNAs obtenus par oligo-dT. Des échantillons contrôles ont été aussi amplifiés par la même méthode afin d'assurer la fiabilité dans notre analyse. Le contrôle H (contrôle positif) est du cDNA d'une plante hybride (*S. lycopersicum* x *S. chilense*) dont le S-allèle est connu et dont la séquence S-RNase a pu être amplifiée avec des amorces spécifiques (Figure 21) ; une bande devrait être amplifiée car cet hybride ne possède qu'une seule S-RNase amplifiable. Les contrôles SL et C- (contrôles négatifs) ne doivent pas avoir de bande. En effet, la tomate cultivée (SL) n'a pas de S-RNase amplifiable et C- est un échantillon sans ajout de cDNA.

Sur le gel (Figure 14), aucune bande d'ADN correspondant à un fragment de S-RNase (+/- 360 pb) n'est visible pour les 4 S-allèles inconnus ainsi que pour les contrôles. Les légères bandes visibles en bas du gel correspondent à une dimérisation d'amorces. Cette PCR a été répétée et les mêmes résultats ont été obtenus. Il n'a donc pas été possible d'amplifier les S-RNases par cette méthode non plus.



Figure 14 : Gel des échantillons PCR convertis en cDNA par la méthode oligo-dT sur les cDNAs pistils de *S. chilense* (SC2), PIS14, PIS 31, PIS 34, PIS 36, un hybride (H), *S. lycopersicum* (SL) et un contrôle négatif (C-). La PCR a été faite avec 4 combinaisons d'amorces différentes : PRO + PR2, PR1 + PR2, PRO + PR3 et PR1 + PR3).

N'arrivant pas à amplifier les S-RNases à partir du cDNA, nous avons tenté à partir d'ADN génomique par PCR emboîtée selon Kondo et al. (2002). Une première expérience test a été réalisée sur des échantillons déjà extraits d'ADN de AC, SC2 (possédant les S-allèles *S10* et *S16*), S10 (un hybride possédant le S-allèle *S10*), et S16 (un hybride possédant le S-allèle *S16*) pour lesquels une amplification a été obtenue avec des amorces spécifiques (Figure 21). Ce premier test avait pour but de voir si la technique fonctionnait. La PCR emboîtée a été testée à plusieurs concentrations d'ADN génomique (1, 3 et 5 μ l) pour déterminer la concentration optimale pour une PCR emboîtée. Un échantillon sans ADN (C-) et un échantillon d'ADN de tomate cultivée (SL) ont été utilisés comme contrôle négatif.

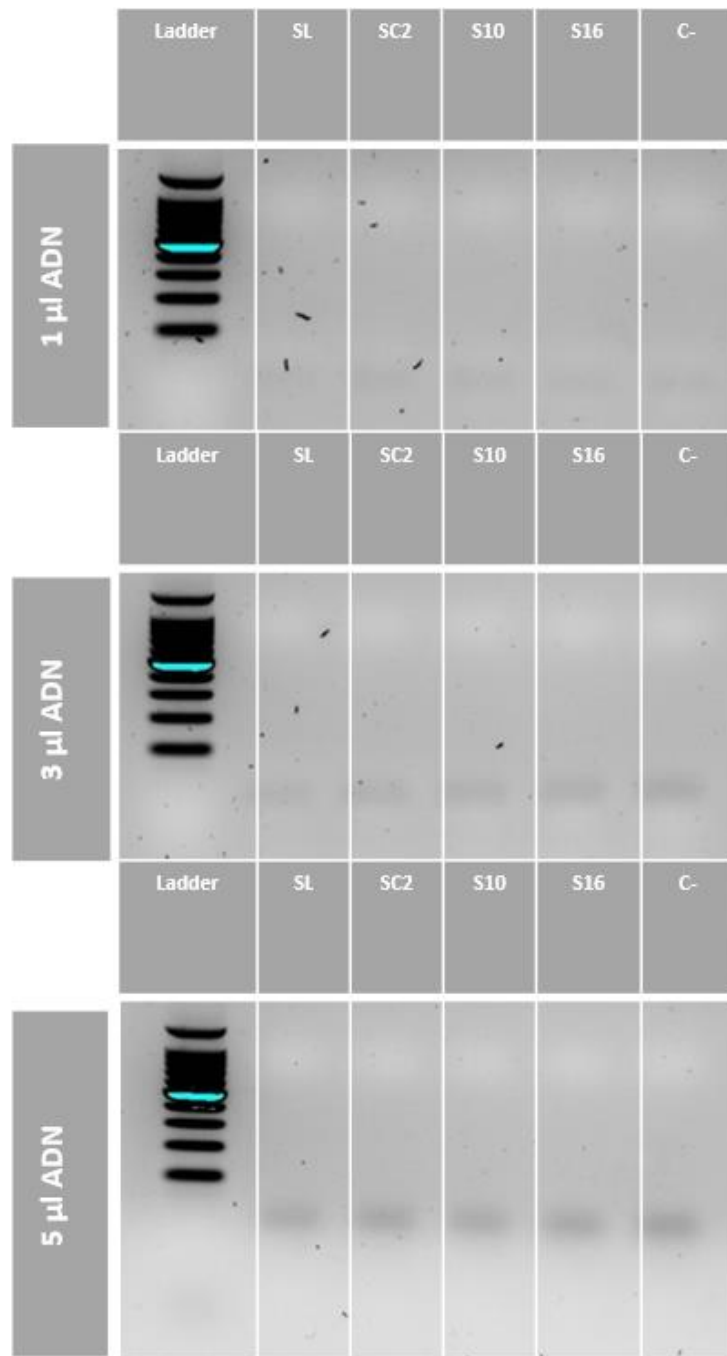


Figure 15 : Gel des échantillons PCR. Les échantillons ont été extraits à partir d'ADN génomique *S. lycopersicum* (SL), de *S. chilense* (SC2), un hybride avec le S-allèle S10 et d'un hybride avec le S-allèle S16. Plusieurs concentrations d'ADN ont été testées (1, 3 et 5 µl) et un contrôle négatif (C-) a été fait pour chaque catégorie de concentration.

Sur le gel (Figure 15), ni le contrôle, ni aucun des échantillons n'ont de fragment d'ADN amplifié. Les seules bandes visibles sont des bandes résultant de la dimérisation des amorces. Aucun S-allèle n'a donc été amplifié par cette méthode. L'expérience test n'étant pas concluante, il a été décidé d'arrêter d'essayer d'amplifier les S-allèles des plantes *S. chilense* dans le cadre de ce mémoire.

Identification des compatibilités dans la population de *S. chilense* par croisements

N'ayant pu identifier les S-allèles par amplification et séquençage, plusieurs types de croisements ont été réalisés entre 20 individus de *S. chilense* pour identifier leur compatibilité (Tableau 6). Pour chaque croisement, le taux de mise à fruit a été calculé. L'objectif de ces mesures était de trouver les croisements compatibles et incompatibles mais aussi de déterminer les génotypes avec des S-allèles différents.

Tableau 6 : Synthèse de tous les croisements entre les individus de la population de *S. chilense* en fonction du taux de mise à fruit. Les colonnes désignent les parents mâles. Les lignes désignent les parents femelles.

Croisement des différents individus de la population : <i>Solanum chilense</i>																					
		Parent mâle																			
		PIS6	PIS9	PIS10	PIS14	PIS17	PIS19	PIS21	PIS23	PIS26	PIS29	PIS30	PIS31	PIS32	PIS33	PIS34	PIS35	PIS36	PIS37	PIS38	PIS40
P a r e n t f e m e l l e	PIS6						x	x													
	PIS9							x													
	PIS10						x	x				x									
	PIS14														x						
	PIS17																				
	PIS19			x																	
	PIS21						x														
	PIS23																				
	PIS26																				
	PIS29																				
	PIS30																				
	PIS31							x													
	PIS32																				
	PIS33							x													
	PIS34																				
	PIS35																				
	PIS36			x																	
	PIS37																				
	PIS38				x		x														
	PIS40						x	x				x									

x : croisements non-compatible (0% de mise à fruit) ; rouge : **croisements peu compatibles** (moins de 50% de mise à fruit) ; vert clair: **croisements moyennement compatibles** (50-75% de mise à fruits) ; vert foncé : **croisements fortement compatibles** (>75% de mise à fruits)

En pratique, 48 croisements ont été réalisés dans toute la population (Tableau 6).

Tout d'abord, 39,58% des croisements n'ont donné aucun fruit. Une absence de fruit suggère une auto-incompatibilité entre les différents génotypes. Les croisements étant probablement AI sont les suivant : PIS 6 x PIS 19, PIS 6 x PIS 21, PIS 9 x PIS 23, PIS 10 x PIS 19, PIS 10 x PIS 21, PIS 10 x PIS 30, PIS 14 x PIS 33, PIS 19 x PIS 10, PIS 21 x PIS 19, PIS 31 x PIS 21, PIS 33 x PIS 21, PIS 33 x PIS 38, PIS 34 x PIS 34, PIS 36 x PIS 10, PIS 38 x PIS 14, PIS 38 x PIS 19, PIS 40 x PIS 19, PIS 40 x PIS 21 et PIS 40 x PIS 30.

35,41% des croisements ont montré un taux de mise à fruit variant entre 5% et 41,67% et ont été classés comme peu compatible. Ces croisements sont : PIS 6 x PIS 9, PIS 6 x PIS 14, PIS 9 x PIS 10, PIS 9 x PIS 14, PIS 9 x PIS 17, PIS 9 x PIS 23, PIS 10 x PIS 32, PIS 17 x PIS 23, PIS 19 x PIS 23, PIS 21 x PIS 36, PIS 29 x PIS 10, PIS 33 x PIS 36, PIS 36 x PIS 21, PIS 37 x PIS 21, PIS 38 x PIS 21 et PIS 33 x PIS 21. Pour ces croisements, le taux mise à fruit variait entre 5% et 41,67%.

18,75% des croisements avaient un taux de mise à fruit entre 50% et 66,67% et ont été classés comme moyennement compatibles. Ces croisements sont : PIS 9 x PIS 26, PIS 10 x PIS14, PIS 14 x PIS 23, PIS 33 x PIS 10, PIS 33 x PIS 40, PIS 34 x PIS 33, PIS 38 x PIS 30, PIS 38 x PIS 36, et PIS 40 x PIS 10. Pour ces croisements, le taux mise à fruit variait entre 50% et 66,67%.

6,25% des croisements ont montré un taux de mise à fruit supérieur à 75% et ont été classés comme fortement compatibles. Ces croisements sont : PIS 10 x PIS 23, PIS 21 x PIS 23 et PIS 33 x PIS 14.

Analyse bio-informatique des S-RNases de *S. chilense*.

N'ayant pu amplifier et séquencer les S-RNases dans notre population de *S. chilense*, il a été décidé que la séquence protéique de la S-RNase de *S. chilense* soit décrite et caractérisée à travers divers outils bio-informatiques.

Structure primaire

La première question était de savoir comment les caractéristiques chimiques de la structure primaire de la S-RNase étaient conservées à travers les différents S-allèles. Pour cela, toutes les séquences d'acide aminés connues de S-RNases de *S. chilense* ont été récupérées du NCBI. Ces séquences sont partielles et ne débutent qu'à partir de la 2^{ème} région conservée de la S-RNase. Une fois les séquences de S-RNases alignées sur Clustal Omega, l'alignement est mis sur WebLogo (Version 3.7.11) pour déterminer les caractéristiques chimiques des S-RNases de *S. chilense*.

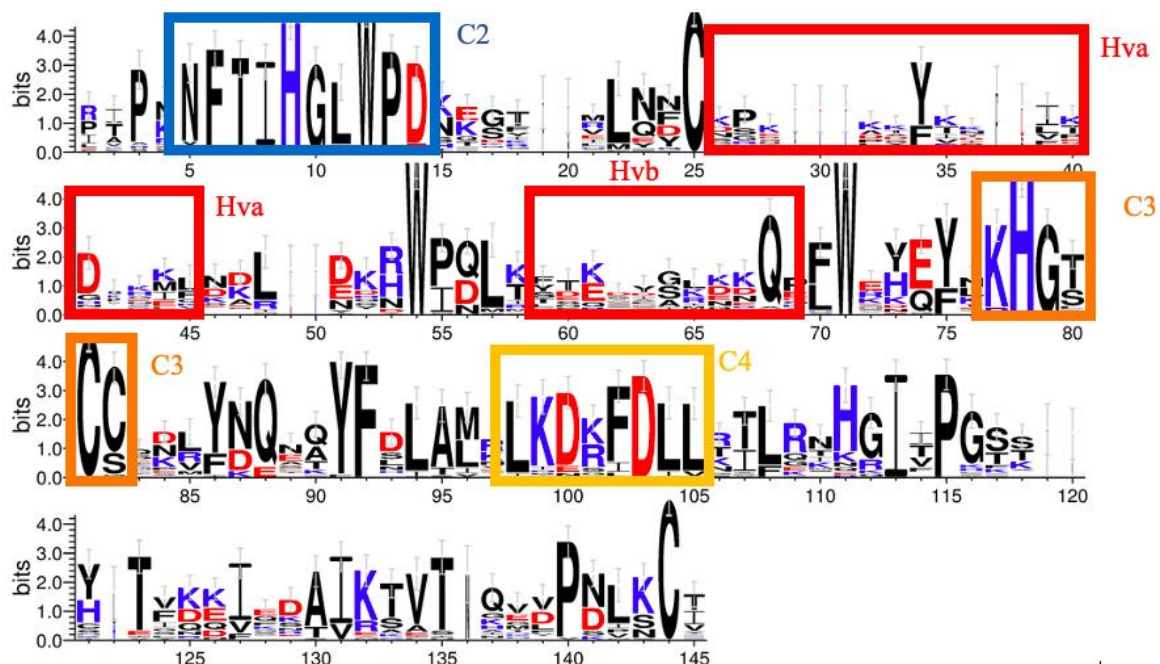


Figure 16 : Weblogo de l'alignement avec toute les séquences partielles de S-RNases connues en fonction de la charge de l'acide aminé à pH physiologique. Bleu = charge positive, noir = neutre, rouge = négatif. Les régions conservées sont encadrées en couleur : bleu foncé = C2, orange = C3, jaune = C4. Rouge = régions hypervariable (Hva et Hvb).

Le premier Weblogo (Figure 16) donne la charge des acides aminés à pH physiologique ainsi que la conservation des acides aminés. La séquence de S-RNase est plus chargée positivement que négativement. Pour la conservation des acides aminés, les thréonines, les cystéines, les histidines, les tryptophanes, les acides aspartiques et les phénylalanines sont les acides aminés les plus conservés dans les S-RNases de *S. chilense*.

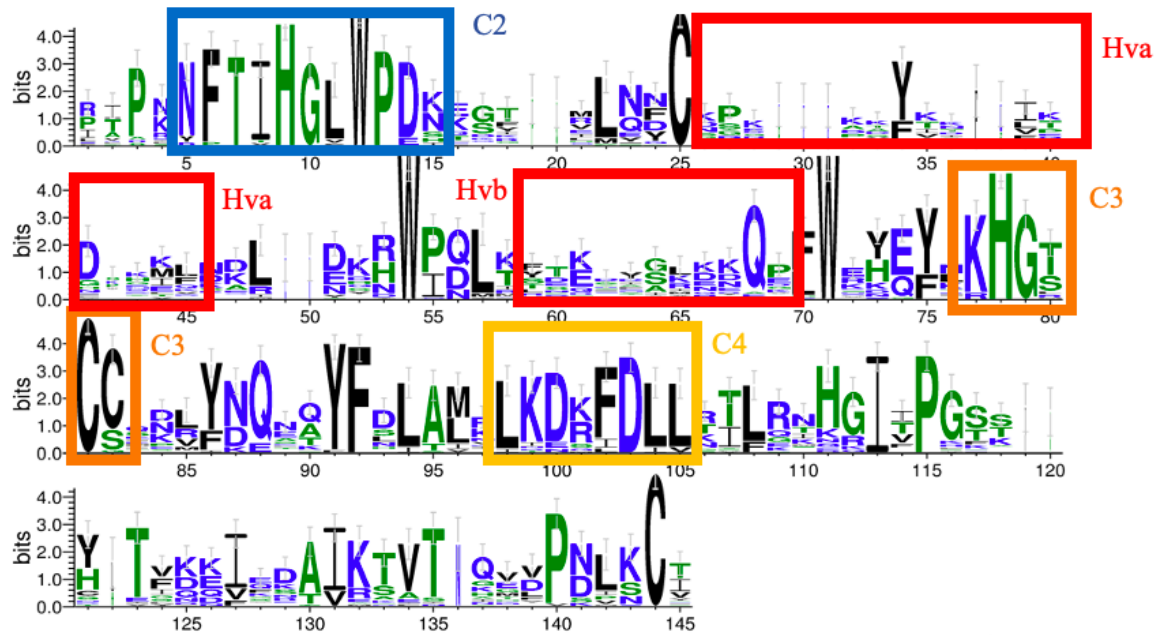


Figure 17 : Weblogo de l'alignement avec toutes les séquences partielles de S-RNases connues en fonction de l'affinité que l'acide aminé a pour l'eau. Bleu = hydrophobe, noir = neutre, vert = hydrophile. Les régions conservées sont encadrées en couleur : bleu foncé = C2, orange = C3, jaune = C4. Rouge = régions hypervariable (Hva et Hvb).

Le deuxième Weblogo (Figure 17) indique l'hydrophobicité des séquences de S-RNases de *S. chilense* ainsi que la conservation des acides aminés. On constate que la séquence est majoritairement hydrophobe. Les acides aminés hydrophiles sont beaucoup moins présents et se situent en majorité aux extrémités de la séquence.

Structure secondaire

Une fois que la séquence primaire a été explorée, la séquence complète d'une S-RNase a été envoyée sur InterPro (InterPro 91.0, <https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) pour prédire les domaines et sites conservés. Sur le NCBI, seule la séquence nucléotidique de la S-RNase du S-allèle S2 (*Solanum chilense* self-incompatibility ribonuclease (S2) gene, GenBank : MW183815.1) de *S. chilense* était complète. Les autres S-RNases n'ont que des séquences partielles sur le NCBI. Par conséquent, S2 était la séquence la plus fiable.



Figure 18 : Identification des domaines conservés sur InterPro. Chaque tranche de couleur indique une prédiction, un site actif, une famille ou une superfamille homologue. Les fonctions moléculaires sont indiquées dans la section GO terms.

Sur InterPro, la séquence de la S-RNase S2 possède un domaine conservé et un peptide signal (Figure 18). Le peptide signal s'étend du 1^{er} au 21^{ème} acide aminé. Ensuite, du 23^{ème} acide aminé au 206^{ème}, la S-RNase S2 possède un domaine conservé appartenant à la famille des Ribonucléase T2. Cette famille des Ribonucléase T2 appartient elle-même à la superfamille des Ribonucléase RH-like. Dans ce domaine, deux sites actifs sont présents. Chacun des sites possède une histidine catalytique permettant d'assurer la fonction de ribonucléase. Le premier site actif se situe entre le 49^{ème} et le 56^{ème} acide aminé. Le deuxième site actif se trouve entre le 103^{ème} et le 114^{ème} acide aminé.

Structure 3D

La structure tridimensionnelle de la S-RNase S2 a été générée sur AlphaFold (Alphafold, <https://alphafold.ebi.ac.uk/>). La S-RNase S2 a été choisie car sa séquence d'acide aminé est la seule séquence complète sur le NCBI. Lors de la génération de la structure tridimensionnelle, les 21 premiers acides aminés ont été enlevés de la séquence car ils correspondent à une séquence signal. Ils sont clivés avant que la protéine soit envoyée dans la matrice extracellulaire.

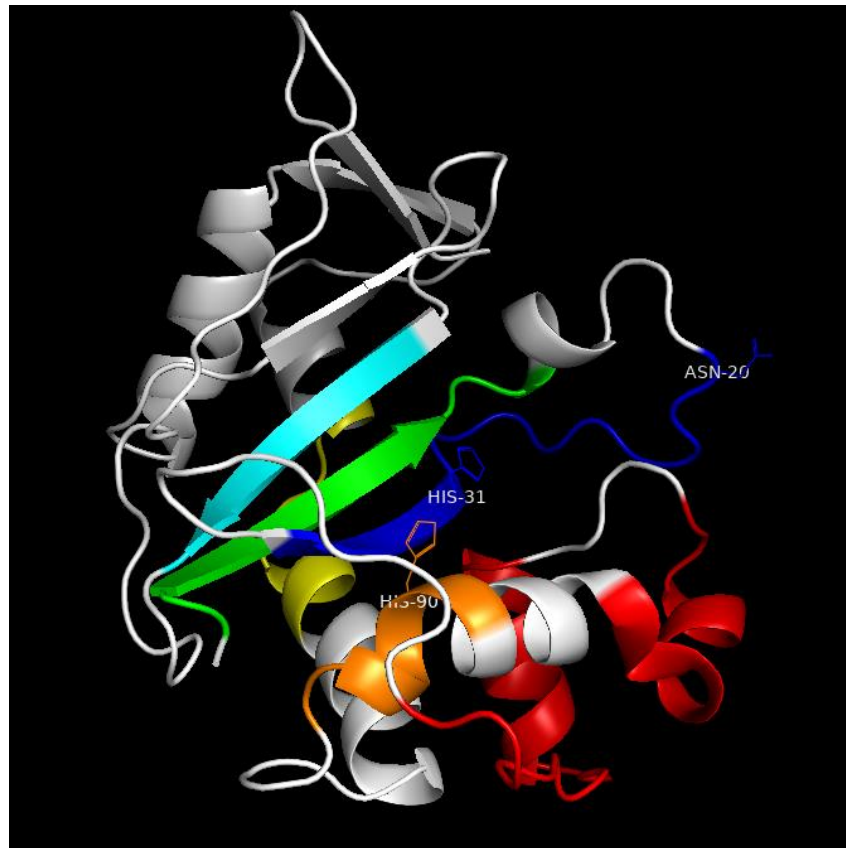


Figure 19 : Structure tridimensionnelle de la S-RNase de S2. Les régions conservées sont indiquées en couleur : vert = C1, bleu foncé = C2, orange = C3, jaune = C4, cyan = C5. Rouge = régions hypervariable (Hva et Hvb). Les structures secondaires des histidines catalytiques et de l'asparagine glycolysable sont mises en évidence.

Les histidines catalytiques et l'asparagine glycolysable sont mises en évidence dans la structure 3D (Figure 19). L'article de Iorger et al. (1991) a permis de pouvoir distinguer les régions hypervariables des régions conservées. Chaque région conservée est marquée d'une couleur spécifique (vert = C1, bleu foncé = C2, orange = C3, jaune = C4, cyan = C5). Les régions hypervariables Hva et Hvb sont colorées en rouge. La structure de la S-RNase est composée de sept hélices alpha et de six feuillets bêta. Les six feuillets bêta forment la partie centrale de la protéine. Les hélices alpha entourent cette structure centrale de feuillets bêta. Les deux sites actifs avec leurs histidines catalytiques (HIS-31 et HIS-90) appartiennent à la région C2 et C3. On remarque que les histidines sont situées dans le sillon central de la protéine et sont proches l'une de l'autre. De plus, l'asparagine glycolysable (ASN-20) appartient à la région C2. Parmi les régions conservées, trois sont des feuillets bêta. Les 2 autres régions conservées forment des parties d'hélices alpha. Les régions hypervariables forment aussi des hélices alpha et se regroupent sur un même côté de la structure.

Arbre phylogénétique

Afin de terminer la caractérisation des S-RNases de *S. chilense*, un phylogramme par maximum de vraisemblance des séquences de S-RNases des différents S-allèles connus de *S. chilense* a été réalisé afin de retracer l'histoire évolutive des différents S-allèles (Figure 20). Cet arbre phylogénétique a été créé sur base de plusieurs alignements locaux de séquences nucléotidiques juxtaposées les unes à côté des autres (Annexe S2). Les séquences nucléotidiques, soit proviennent des S-RNases de *S. chilense* disponibles sur le NCBI, soit ont été identifiées au laboratoire lors d'un précédent mémoire (S8 : homologue à la S-RNase S8 de *S. pimpinellifolium* et S16 : homologue à la S-RNase S16/SP13 de *S. peruvianum*) (Moreels.,

2022). Cet arbre permet d'observer la diversité de séquences des S-RNases et d'identifier les séquences homologues les plus proches.

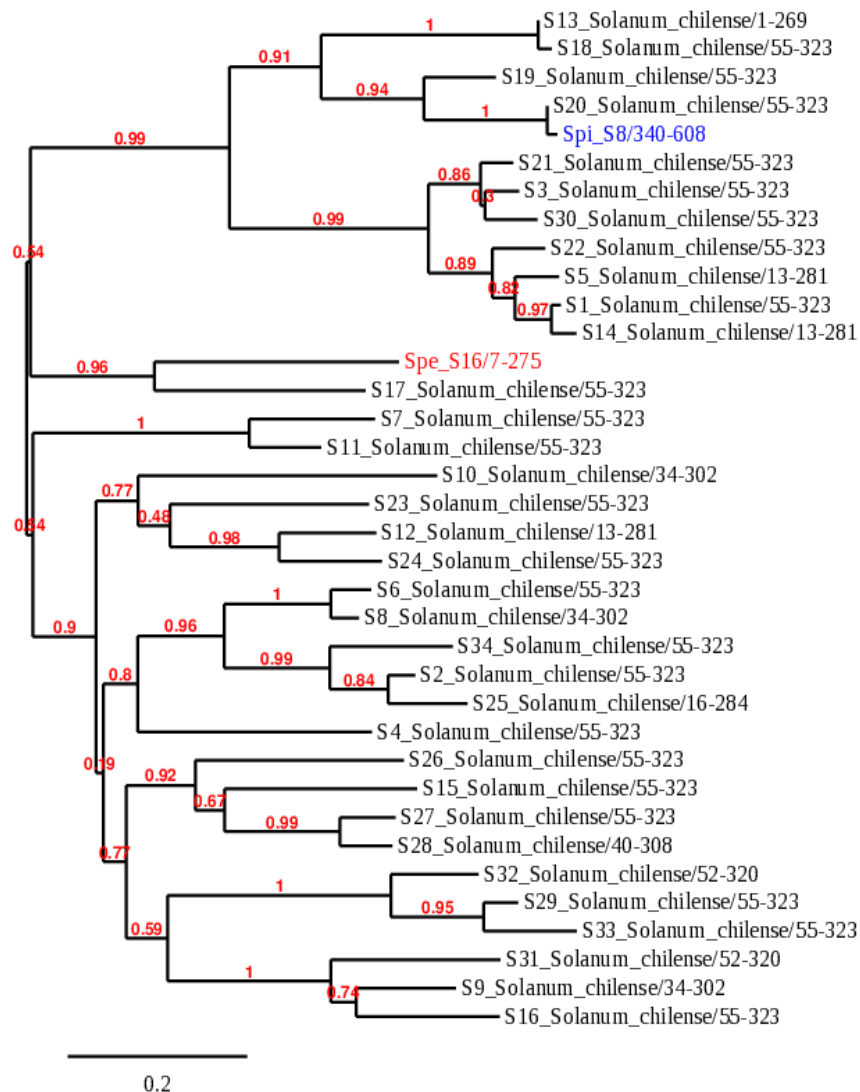


Figure 20 : Phylogramme par maximum de vraisemblance des S-allèles de *Solanum chilense*. Le S-allèle S8 est coloré en bleu et le S-allèle S16 est coloré en rouge. Il est important de savoir que l'allèle S16 de *S. chilense* et l'allèle S16 découvert au laboratoire (rouge) ne sont pas les mêmes S-allèles.

L'arbre sépare tout d'abord un clade de 14 S-allèles de 22 autres S-allèles (Figure 20). Dans les 14 S-allèles, trois subdivisions séparent le clade : un nœud avec 2 S-allèles très éloignés des autres deux nœuds de 5 et 7 S-allèles. Pour les 21 autres S-allèles, quatre subdivisions séparent le clade : un nœud éloigné de 2 S-allèles et trois nœuds proches de respectivement 4, 6 et 10 S-allèles. Les deux S-allèles découverts au laboratoire sont colorés en rouge et en bleu. S17 est la S-RNase possédant l'ancêtre commun le plus proche de S16. Le S-allèle partageant l'ancêtre commun le plus proche de S8 est S20. L'ordre de notation des S-allèles ne corrèle pas avec l'histoire évolutive partagée entre eux.

B – Les S-RNases chez les hybrides

Identification et répartition des S-allèles dans la population d'hybrides

Pour pouvoir identifier les S-allèles des populations d'hybrides, la connaissance des S-allèles des parents est importante. La plante de *S. chilense* SC2 (parent mâle des hybrides) possède les S-allèles *S10* et *S16* (Moreels, 2022) tandis que les S-allèles de *S. lycopersicum* codent pour des S-RNases tronquées, non fonctionnelles et non classifiées. Des amorces spécifiques ont donc été dessinées pour les S-RNases *S10* et *S16* (*S16/SP13 S. peruvianum*) (Tableau 4, Annexe S1).

En pratique, une PCR avec des amorces spécifiques aux S-allèles *S10* et *S16* a permis d'identifier les S-allèles des hybrides (Figure 21). Lors de la PCR, le gène contrôle *LeEF1alpha* a été utilisé comme témoin positif.

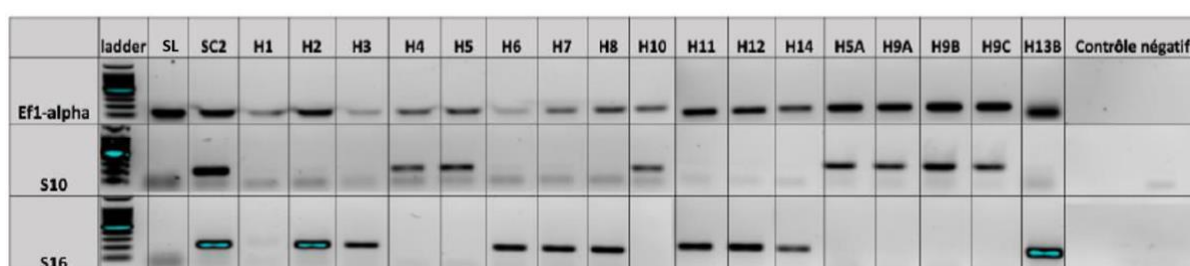


Figure 21 : Gel de vérification des allèles *S10* et *S16* sur *S. lycopersicum* (SL), *S. chilense* (SC2) et leurs hybrides (H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H10, H11, H12, H14, H5A, H9A, H9B, H9C et H13B). *LeEF1alpha* est un « gène domestique » servant de contrôle positif.

Parmi les 17 hybrides présents sur le gel, 41,2% des hybrides possèdent l'allèle *S10* et 52,9% possèdent l'allèle *S16*. Certains hybrides possèdent une bande moins fluorescente en dessous du fragment de S-allèle amplifié. Cette bande résulte de la dimérisation des amorces lors de la PCR.

Croissance des tubes polliniques pour les croisements entre hybrides

Afin de voir s'il existe une auto-incompatibilité chez les hybrides, des croisements ont été réalisés entre hybrides ayant le même S-allèle (*S10* x *S10*, *S16* x *S16*) ou différant par leur S-allèle (*S10* x *S16*, *S16* x *S10*) et la croissance des tubes polliniques a été suivie. La croissance des tubes polliniques a été mesurée en fonction de leur présence dans le 1^{er}, 2^{ème} ou 3^{ème} tiers du style (Figure 22).

Dans le premier tiers du style (Figure 22 A), le pourcentage de tubes polliniques en croissance ne différait pas en fonction du croisement ($\chi^2 = 7,5414$ et p-val = 0,0565). Par contre, dans le deuxième tiers ($\chi^2 = 19,147$ et p-val = 0,0002549) et le troisième tiers ($\chi^2 = 10,988$ et p-val = 0,01179), le pourcentage de tubes polliniques en croissance différait entre croisements (Figure 22 B). En effet, des tubes polliniques étaient présents dans les 2^{ème} et 3^{ème} tiers du style pour les croisements entre plantes ayant des S-allèles différents alors que respectivement un seul tube pollinique et aucun tube pollinique n'étaient présents dans le 2^{ème} tiers du style pour les croisements *S16* x *S16* et *S10* x *S10*.

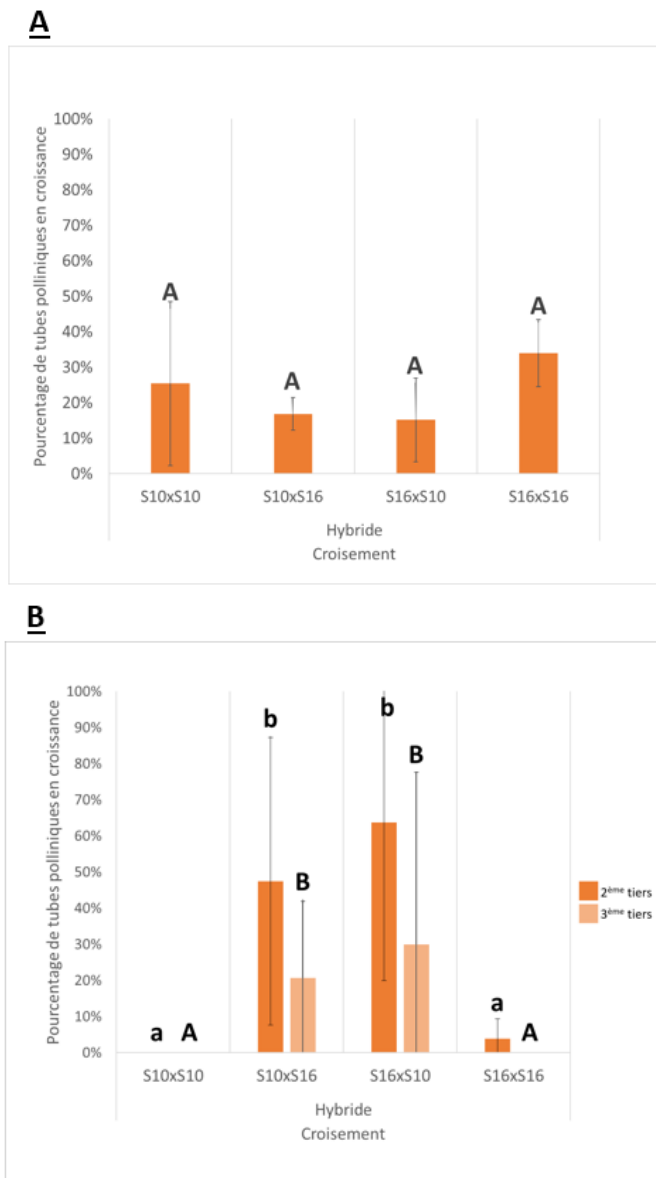


Figure 22 : A. Pourcentage des tubes polliniques en croissance dans le premier tiers pour les croisements entre hybrides (% par rapport au nombre de grains de pollen sur le stigmate). B. Pourcentage des tubes polliniques en croissance dans les deuxièmes et troisième tiers pour les croisements entre hybrides (% par rapport aux tubes polliniques présents dans le 1^{er} tiers). Pour un même niveau du style, les croisements partageant une même lettre dans une comparaison 2 à 2 ne sont pas significativement différents au seuil 5%.

Partie 2 : Incompatibilité unilatérale

Croisements entre *S. lycopersicum* et *S. chilense*

Afin de voir s'il existe des barrières reproductrices inter-espèces, quatre croisements ont été réalisés : deux croisements interspécifiques (SC2 x SL et SL x SC2) et deux autopollinisations (SL x SL et SC2 x SC2), ces dernières servant de contrôles. Pour comprendre l'incompatibilité unilatérale à l'échelle histologique, la croissance des tubes polliniques a été suivie en fonction de la présence des tubes polliniques dans les différents tiers du style (Figure 23).

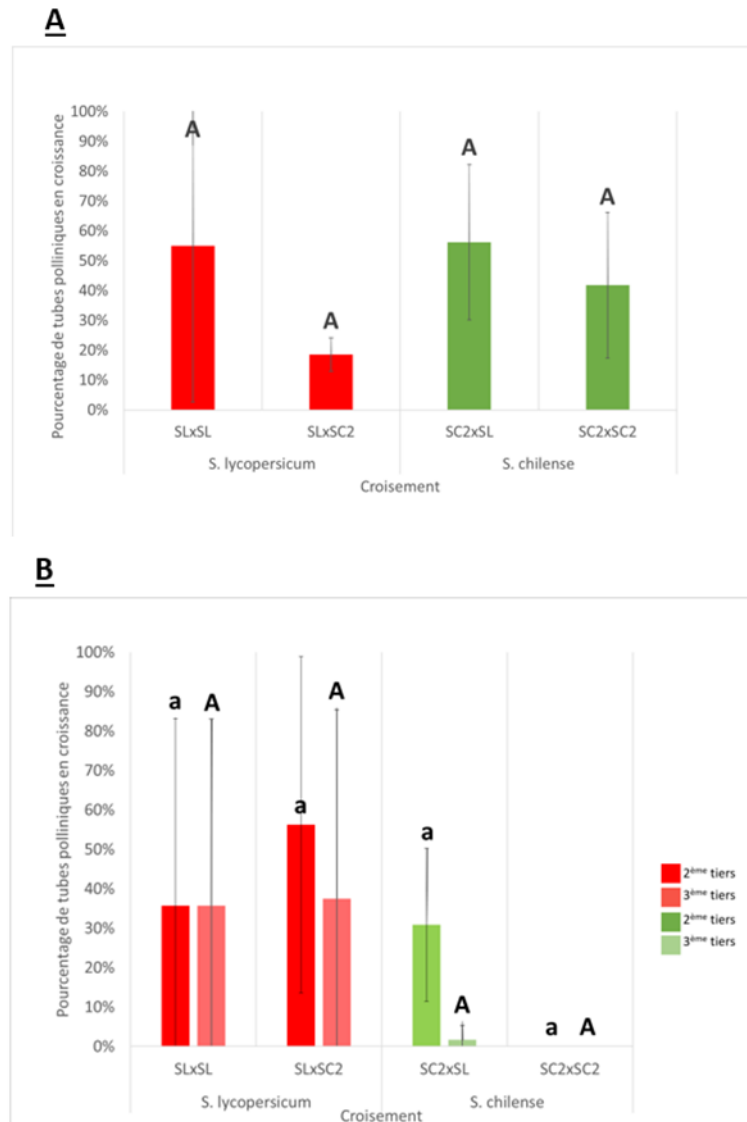


Figure 23 : Pourcentage des tubes polliniques en croissance dans (A) le premier tiers (% par rapport au nombre de grains de pollen sur le stigmate), (B) les 2^e et 3^e tiers du style (% par rapport aux tubes polliniques présents dans le 1^e tiers) pour les croisements interspécifiques et intraspécifiques entre *S. lycopersicum* et *S. chilense*. Rouge et rose = *S. lycopersicum* var. Ailsa Craig en parent femelle, vert = *S. chilense* en parent femelle. Pour un même niveau du style, les croisements partageant une même lettre dans une comparaison 2 à 2 ne sont pas significativement différents au seuil 5%.

Dans le premier tiers du style, le pourcentage de tubes polliniques en croissance ne différait pas en fonction du croisement ($\chi^2=3,5594$ et p-val = 0,3131 ; Figure 23 A). En moyenne, près de 50% des grains de pollen ont développé un tube pollinique pour les croisements intraspécifiques

et pour SC2 X SL tandis que pour le croisement SL X SC2, seuls 18,5% des grains de pollen ont développé un tube pollinique. Au contraire du 1^{er} tiers du style, le pourcentage de tubes polliniques en croissance différait en fonction des croisements dans le 2^{ème} ($\chi^2 = 11,435$ et p-val = 0,00959) et le 3^{ème} tiers du style ($\chi^2 = 8,8098$ et p-val = 0,03193, Figure 23 B). En moyenne, le nombre de tubes polliniques dans les 2^{ème} et 3^{ème} tiers étaient plus élevés pour les croisements SL x SL et SL x SC2 que ceux du croisement SC2 X SL. En revanche, aucun tube pollinique n'a poussé dans le 2^{ème} tiers du croisement SC2 X SC2. Ces différences n'apparaissent pas comme significatives dans les comparaisons 2 à 2 étant donné la forte variabilité au sein de chaque croisement.

Il n'a pas été possible de suivre le taux de mise à fruits et le développement des fruits pour ces croisements dans le cadre de ce mémoire car les croisements ont été réalisés en octobre – novembre.

Rétrocroisements entre les hybrides et leurs parents

Les hybrides obtenus en pollinisant *S. lycopersicum* (SL) avec du pollen de la plante *S. chilense* SC2 ont été rétrocroisés avec leurs parents respectifs. Le taux de mise à fruit a été calculé pour trouver les croisements compatibles et incompatibles. Les résultats sont disponibles dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Rétrocroisements des hybrides avec leurs parents respectifs

Rétrocroisements et croisements des hybrides									
Parent femelle	Parent mâle								
		SC2	H4A	H5A	H9A	H9B	H9C	H13B	SL
	SC2		x	x	x	x	x	x	
	H4A								x
	H5A								
	H9A	x							
	H9B								
	H9C	x							x
	H13B	x							x
	SL								

Noir : pas de croisement ; x : croisements non-compatible (0% de mise à fruit) ; rouge : **croisements peu compatibles** (moins de 50% de mise à fruit) ; vert clair : **croisements moyennement compatibles** (50-75% de mise à fruits) ; vert foncé : **croisements fortement compatibles** (>75% de mise à fruits)

Aucun des croisements, avec SC2 comme parent femelle et des hybrides comme parent mâle, n'a donné de fruits. De même, aucun des croisements ayant un hybride comme parent femelle et SL comme parent mâle n'a donné de fruits non plus. Par contre, les croisements avec SL comme parent femelle et des hybrides (H9C et H13B) comme parent mâle ont montré un taux de mise à fruit de moyennement (>50%) à fortement (>75%) compatibles. Pour les croisements entre les hybrides comme parent femelle et SC2 comme parent mâle, deux (H4A et H5A) étaient moyennement compatibles, un (H9B) était peu compatible et 3 (H9A, H9C, H13B) n'ont donné aucun fruit.

Pour confirmer les résultats ci-dessus et pour mieux comprendre l'incompatibilité unilatérale entre les hybrides et leurs parents au niveau histologique, des rétrocroisements ont été réalisés entre des hybrides (avec le S-allèle *S10* ou *S16*) et leurs parents. La croissance des tubes polliniques a alors été suivie. Les croisements réalisés sont : SL x *S10*, SL x *S16*, *S10* x SL, *S10* x SC2, *S16* x SL, *S16* x SC2, SC2 x *S10*, SC2 x *S16*.

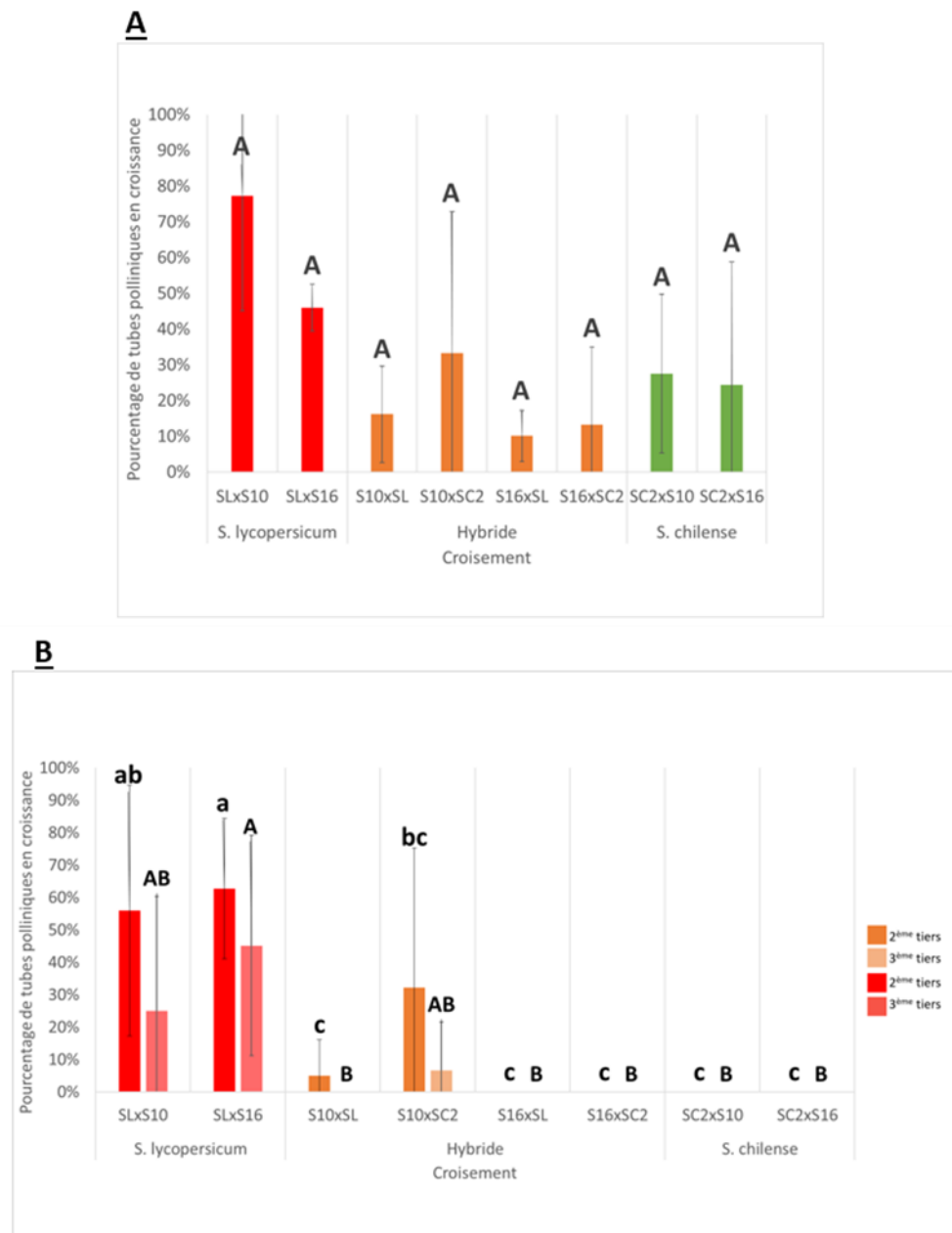


Figure 24 : Pourcentage de tubes polliniques en croissance dans (A) le premier tiers (% par rapport au nombre de grains de pollen sur le stigmate), et (B) les 2^e et 3^e tiers du style (% par rapport aux tubes polliniques présents dans le 1^e tiers) pour les rétrocroisements entre les hybrides et leurs parents *S. lycopersicum* et *S. chilense*. Rouge et rose = *S. lycopersicum* var. Ailsa Craig en parent femelle, orange = hybrides en parent femelle, vert = *S. chilense* en parent femelle. Pour un même niveau du style, les croisements partageant une même lettre dans une comparaison 2 à 2 ne sont pas significativement différents au seuil 5%.

Dans le premier tiers du style (Figure 24 A), le pourcentage de tubes polliniques en croissance différait légèrement en fonction du croisement ($\chi^2 = 14,301$ et p-val = 0,04608) même si les

résultats statistiques ne sont plus significatifs pour les comparaisons 2 à 2 suite à la grande variabilité au sein d'un même croisement. Globalement, les croisements avec SL comme parent femelle avaient plus de grains de pollen qui germaient que les croisements avec *S. chilense* et les hybrides comme parents femelles.

Dans le deuxième tiers du style (Figure 24 B), le pourcentage de tubes polliniques en croissance différait fortement selon le croisement ($\chi^2 = 141,63$ et p-val = $2,2 \times 10^{-16}$). Les croisements avec SL comme parent femelle avaient plus de tubes polliniques dans le 2^{ème} tiers du style. Cependant, ceux avec S10 comme parents femelles ne présentaient que quelques tubes polliniques dans le 2^{ème} tiers du style alors qu'aucun tube pollinique n'a poussé dans le 2^{ème} tiers du style pour les croisements ayant S16 et SC2 comme parent femelle.

Pour le 3^{ème} tiers (Figure 24 B), la situation était comparable au 2^{ème} tiers du style : le pourcentage de tubes polliniques en croissance différait aussi selon le croisement ($\chi^2 = 64,359$ et p-val = $2,022 \times 10^{-11}$). Les comparaisons 2 à 2 permettaient de séparer en trois groupes les rétrocroisements : (1) SL x S16 montrait le nombre de tubes polliniques le plus élevé; (2) SL x S10 et S10 x SC2 avec un faible nombre de tubes polliniques ; (3) S10 x SL et les rétrocroisements avec S16 ou SC2 en tant que parent femelle sans aucun tube pollinique dans le 3^{ème} tiers du style.

Partie 3 : Expression de *DIR1L*

Arbre phylogénétique

La séquence de *Solanum pimpenifolium* de *DIR1L* a servi à rechercher les séquences homologues chez les autres espèces du clade de la tomate par BLAST sur le site du NCBI et du Solanum Genomic Network. Après alignement via Clustal Omega (Annexe S3), un arbre phylogénétique a été créé avec phylogeny.fr. L'arbre phylogénétique du gène *DIR1L* (Figure 25) sépare d'abord 2 membres du groupe de la tomate (*S. peruvianum* et *S. pimpenifolium*) des autres. Ensuite, *S. tuberosum* est plus proche phylogénétiquement de *S. lycopersicum* et de *S. chilense* que des 3 autres membres du clade des tomates pour *DIR1L*. Finalement, la séquence de *S. pennellii* est homologue à celle de *S. chilense* pour *DIR1L*. L'arbre confirme donc que les séquences identifiées pour *S. lycopersicum* et *S. chilense* sont homologues à *SpDIR1L* et qu'il n'y a qu'une copie de ce gène chez ces espèces

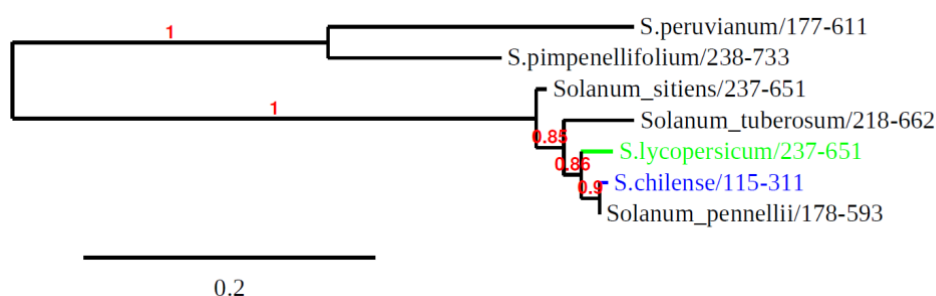


Figure 25 : arbre phylogénétique de *DIR1L* avec des espèces de tomates : *Solanum peruvianum*, *Solanum pimpenellifolium*, *Solanum sitiens*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum chilense* et *Solanum pennellii* ainsi qu'une espèce de pomme de terre (*Solanum tuberosum*).

RT-qPCR

Après la création de l'arbre phylogénétique, l'expression du gène de *DIR1L* a été étudiée par qPCR dans les pistils et les étamines de fleurs en anthèse chez *S. lycopersicum*, *S. chilense* et leurs hybrides. Les amorces communes aux séquences *DIR1L* de *S. lycopersicum* et *S. chilense* ont été utilisées et les gènes *TIP41* (*TAP42 INTERACTING PROTEIN*) et *LeEF1 α* (*ELONGATION FACTOR 1-ALPHA*) ont servi comme gènes de référence.

L'expression de *DIR1L* était la plus élevée dans les pistils de *S. chilense* (SC2), suivi par les hybrides (H9B, H13B) et était la plus basse chez *S. lycopersicum* (SL) ($F_{2,6}=199,5772$; $p\text{-val} < 0,0001$, Figure 26). A l'inverse, pour les étamines, *S. lycopersicum* montrait l'expression la plus forte, suivi par les hybrides puis par SC2 ($F_{3,8}=128,2595$; $p\text{-val} < 0,0001$, Figure 26).

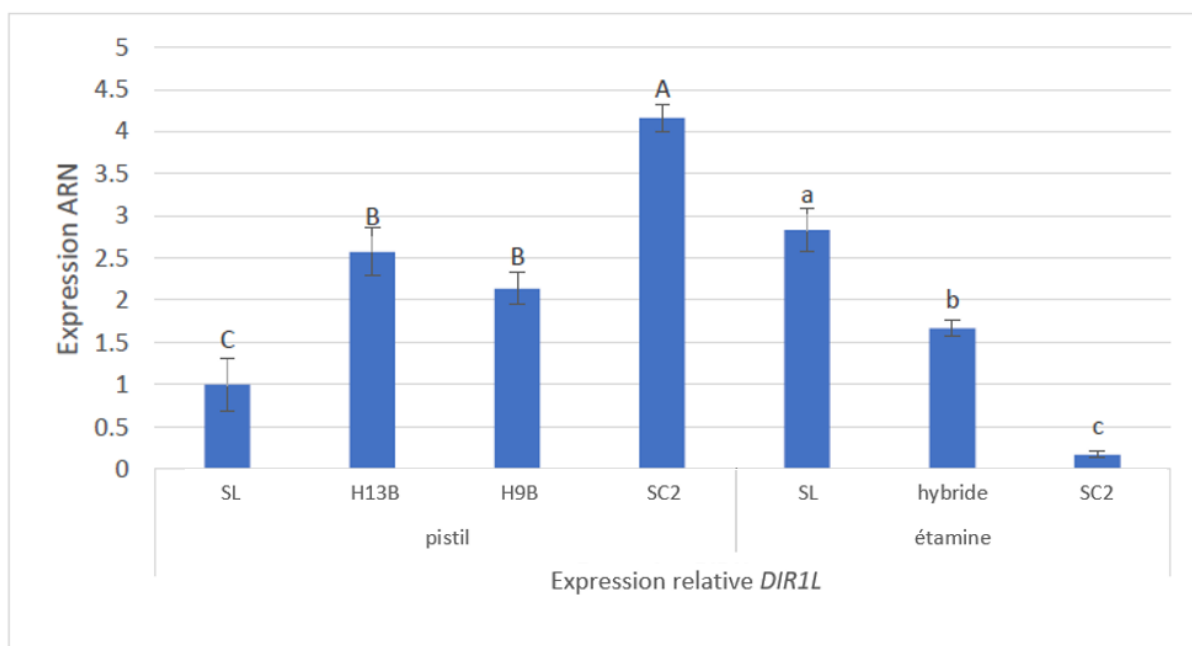


Figure 26 : Expression de *DIR1L* normalisé aux pistils de *Solanum lycopersicum* (SL). H9B et H13B sont des hybrides dont le parent mâle est l'individu SC2 de *Solanum chilense*.

Discussion

S-RNase

Structure

La description des structures primaire, secondaire et tridimensionnelle de la S-RNase de *Solanum chilense* permet de mieux comprendre comment la S-RNase interagit avec ses cibles et son environnement.

Tout d'abord, la structure primaire de la S-RNase de *S. chilense* posséderait bien des régions conservées et des régions hypervariables (Figure 16). En comparant nos alignements des séquences partielles de S-RNases de *S. chilense* avec les alignements de trois espèces de Solanaceae (*Nicotiana glauca*, *Petunia inflata*, et *Solanum chacoense*) de Iorger et al (1991), il est possible de retrouver dans les séquences de *S. chilense* les mêmes motifs de régions conservées que ceux de l'article. De plus, certains acides aminés sont parfaitement conservés à plusieurs endroits de la séquence. C'est le cas de plusieurs cystéines (25, 81, 144), de tryptophanes (12, 54, 71), d'une proline (115) et d'une phénylalanine (92). Ces acides aminés pourraient avoir un rôle fonctionnel ou structurel important dans la formation de la protéine. Cette hypothèse serait d'autant plus plausible pour les cystéines car les ponts disulfures sont essentiels à la stabilité d'une protéine. On estime que dans le clade des *Solanum*, 3 à 4 ponts disulfures sont conservés (Brisolara-Correa et al., 2015). Le reste des cystéines se trouveraient à l'extérieur de nos séquences partielles. Même si l'asparagine en position 5 n'est pas totalement conservée, il est très probable que cette asparagine soit le site de glycosylation des S-RNases décrit par Iorger et al (1991). Deux histidines (9 et 78) sont aussi parfaitement conservées dans les alignements des séquences des S-RNases de *S. chilense*. Grâce à InterPro, ces histidines ont pu être reconnues comme deux acides aminés essentiels aux deux sites catalytiques de l'enzyme.

Pour la structure secondaire, des domaines conservés homologues ont pu être identifiés sur la séquence S2 complète de *S. chilense*. En premier, un domaine similaire à la famille des ribonucléases fongiques T2 est prédit (Figure 18). La famille des ribonucléases T2 appartient elle-même à la superfamille des ribonucléase Rh. La famille des ribonucléases T2 possède une structure tertiaire « alpha/beta core » qui est fortement conservée chez les bactéries, plantes et champignons (Luthala et Parker., 2010, Thorn et al., 2012). La structure tridimensionnelle a révélé que les régions conservées se situent majoritairement au centre de la structure comme les histidines catalytiques (Figure 19). Les régions hypervariables se situent à l'extérieur de la structure. Cette disposition des régions conservées et hypervariables semble être préservée dans le clade *Solanum*. En effet, la structure 3D est fortement comparable aux résultats de Brisolara-Correa et al (2015) concernant les structures tridimensionnelles des S-RNases pour le clade *Solanum*. Le peu d'informations sur la biochimie structurale des S-RNases nous empêche d'aller plus loin dans l'analyse. Cependant, la visualisation de la protéine en 3D a montré l'existence d'un sillon où se situent les histidines catalytiques dans la protéine. Il est possible que l'ARN rentre dans ce sillon pour se faire dégrader en son centre par les histidines catalytiques.

Diversité

Pour une espèce végétale avec une auto-incompatibilité gamétophytique, on considère qu'il doit exister autour d'une cinquantaine de S-allèles (Igic et al. 2007). A ce jour, 36 S-allèles ont été identifiés pour *S. chilense*. Parmi ces S-allèles, il est connu que les séquences de S-RNases sont plus proches entre mêmes S-allèles d'espèces différentes qu'entre S-allèles de la même espèce. En effet, la diversification des S-allèles précède l'apparition de l'espèce (Brisolara-Correa et al., 2015). Cette hypothèse est corrélée à l'arbre phylogénétique des S-RNases de *S.*

chilense. Les S-allèles *S8* (homologue à la S-RNase *S8* *S. pimpinellifolium*) et *S16* (homologue à la S-RNase *S16/SP13* de *S. peruvianum*) découverts au laboratoire sont plus proches des homologues d'autres espèces que des S-allèles phylogénétiquement les plus proches au sein de l'espèce *S. chilense*, à savoir les S-allèles *S20* et *S17* (Figure 20) (Moreels., 2022).

Difficulté d'amplification

Lors de ce mémoire, un des sujets principaux de la recherche sur les S-RNases était l'identification des S-allèles dans nos populations de *S. chilense*. Pour identifier ces S-RNases, la méthode courante est une extraction d'ARN des pistils suivi d'une rétrotranscription par la méthode RACE (3'-rapid amplification of cDNA ends) de Igic et al. (2007). Cette méthode nous a permis par le passé d'identifier des S-allèles de *S. chilense* (Moreels, 2022). En effet, en partant de l'ARN de pistil, on maximise les chances de trouver des S-RNases et non d'autres types de RNases présentes dans le génome de la plante (Quinet et al. 2014, Raspé et Kohn, 2007). Cependant, lors de nos expériences, la méthode RACE a été répétée plusieurs fois sans succès sur les échantillons d'ARN. Suite aux échecs de la méthode RACE (Figure 12), deux nouvelles méthodes avaient été mise en place. La méthode de Richman et al (1995) utilisait des amorces sur des régions conservées de *S. chilense* pour amplifier du cDNA obtenu par rétrotranscription oligo-dT. La méthode selon Kondo et al (2002) partait d'une PCR emboîtée avec des échantillons d'ADN génomique. Malgré les nombreux essais de chaque méthode, aucune amplification de S-RNase n'a été possible (Figure 14 et 15). L'absence d'amplification de S-RNase est potentiellement due à un facteur extérieur à la technique en elle-même. Il est probable que les ARN de pistils aient été prélevés à un moment où la S-RNase n'était pas ou trop peu transcrite. Les séquences des S-RNases de nos plantes pourraient être aussi trop différentes des amorces PR0, PR1, PR2 et PR3. Pour la méthode RACE, il est assez occasionnel de ne pas pouvoir rétrotranscrire ses échantillons à cause d'une trop faible stringence des amorces (Chen et Weisheng., 2013). La diversité de séquences entre les S-RNases d'une même espèce rend la recherche d'amorces générales difficile (Raspé and Kohn, 2007).

En ce qui concerne l'amplification avec ADN génomique selon Kondo et al (2002), il est possible que des introns inconnus, ou bien la taille de la séquence génomique à ce jour, empêchent l'attachement des amorces rendant l'amplification du gène impossible. Par contre, l'amplification a été possible chez les hybrides à partir d'amorces spécifiques. Au demeurant, il n'est pas possible de dessiner des amorces spécifiques pour tous les S-allèles ou lorsque la séquence de la S-RNase n'est pas connue.

Auto-incompatibilité

Solanum chilense

Des expériences précédentes ont permis d'identifier certains S-allèles de la population de *S. chilense* (Figure 27). Ainsi, il a été découvert que PIS 23 possède les S-allèles *S8* et un S-allèle inconnu. PIS 9 possède *S10* et *S16/SP13*.

En partant du tableau de croisement des *S. chilense* (Tableau 6), il est possible de prédire au moins un S-allèle de certaines plantes en fonction des croisements avec PIS 23 et PIS 9 (Figure 27). En effet, PIS 9 x PIS 21 est un croisement incompatible. On peut donc supposer que PIS 21 possède un S-allèle commun à PIS 9. Ce S-allèle serait le seul partagé entre les deux individus car PIS 10 x PIS 21 fonctionne mais PIS 9 x PIS 10 est un croisement compatible. De plus, PIS 19 partagerait le même S-allèle que PIS 10 et PIS 21 car PIS 10 x PIS 21 et PIS 10 x PIS 19 ne sont pas des croisements compatibles. De même, PIS 40 doit posséder un S-allèle commun à PIS 19 et PIS 21 car PIS 40 x PIS 21 et PIS 40 x PIS 19 sont des croisements incompatibles. Vu que PIS 40 x PIS 10 est compatible, il est probable que l'autre S-allèle de PIS 21 partagé avec PIS 9 soit aussi le même S-allèle que chez PIS 40 et PIS 19. Pour PIS 10,

son deuxième S-allèle est commun à un des S-allèles de PIS 36 car PIS 36 x PIS 10 est un croisement incompatible et PIS 36 x PIS 21 est un croisement compatible. Finalement, il est possible que PIS 38 et PIS 19 possèdent au moins un S-allèle commun car PIS 38 x PIS 19 est un croisement incompatible.

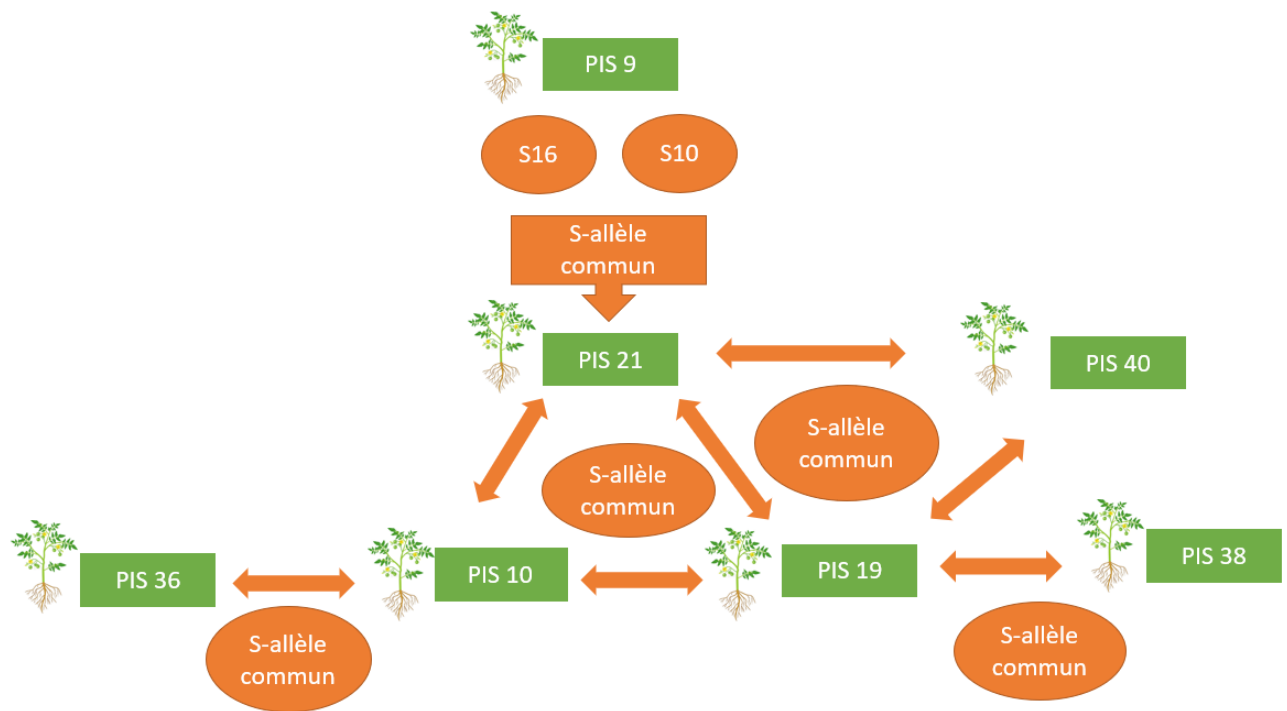


Figure 27 : Représentation schématique des S-allèles partagés dans la population. Les individus de la population de *S. chilense* sont nommés PIS (PIS 9, PIS 10, PIS 19, PIS 21, PIS 36, PIS 38, PIS 40). Ovale = S-allèle. Les flèches représentent les S-allèles partagés dans la population du laboratoire.

En regardant globalement le tableau de croisement (Tableau 6), on se rend compte que PIS 19 n'a eu qu'un seul croisement compatible sur sept. PIS 21 a eu sept croisements incompatibles sur douze. PIS 40 pour sa part a eu trois croisements sur cinq incompatibles. Il semblerait donc que PIS 19, PIS 21 et PIS 40 aient des S-allèles communs dans la population. A l'inverse, PIS 23 n'a aucun croisement incompatible sur six et PIS 9 n'a qu'un seul croisement incompatible sur sept. Il semblerait donc que PIS 9 possède des S-allèles moins communs dans la population et PIS 23 possède des S-allèles rares dans la population. Pour rester critique face à ces hypothèses, l'analyse s'est fortement concentrée sur ces individus en raison des résultats préliminaires du mémoire de Moreels (2022). Il est certain qu'un biais dans notre analyse existe en disant que ces individus ont des S-allèles communs ou rares dans notre population. D'autres individus auraient pu avoir des S-allèles communs ou rares en fonction des croisements réalisés tout au long de ce mémoire.

Cependant, la fréquence d'un S-allèle dans une population peut varier énormément au cours du temps. Les plantes avec un S-allèle rare se reproduiront plus que les plantes avec un S-allèle commun. Par conséquent, les S-allèles communs seront sélectionnés négativement et leur fréquence diminuera au cours du temps (Wright, 1939). Cette sélection négative serait une des causes du polymorphisme persistant des séquences de S-allèles (Igic et al., 2007, Liao et al., 2020, Paape et Khon, 2011, Williams et al., 2015). Il est donc difficile d'affirmer qu'un S-allèle rare dans la population du laboratoire est aussi rare dans la nature.

Lors des différents croisements dans la population de *S. chilense* x *S. chilense*, il a été remarqué que le taux de mise à fruit ne respectait pas la génétique mendélienne. En effet, lors d'un croisement dans une espèce AI gamétophytique, trois scénarii seraient possibles :

- 1) Aucun des deux S-allèles n'est commun entre les parents. Le croisement est compatible et le taux de mise à fruit devrait être de 100%
- 2) Un des deux S-allèles est partagé entre les parents. Le croisement est semi-compatible et le taux de mise à fruit est de 50%.
- 3) Les deux S-allèles sont partagés entre les parents. Le croisement est incompatible et le taux de mise à fruit est de 0%.

En regardant le tableau de croisement (Tableau 6), il semblerait que le taux de mise à fruit soit plutôt graduel que mendélien. Plusieurs explications pourraient argumenter en faveur d'un taux de mise à fruit graduel.

Premièrement, les facteurs abiotiques et biotiques de la serre ont pu modifier le taux de mise à fruit. Les hautes températures en 2022 et les différentes carences des plantes au cours de l'année ont eu un impact sur la formation de fruits chez *S. chilense*. De plus, des ravageurs tel que des cochenilles, thrips et chenilles ont probablement impactés négativement le taux de mise à fruit.

Deuxièmement, l'interaction entre les SLFs et les S-RNases n'est pas prise en compte dans le modèle mendélien. Les précédentes théories sur l'AIG du clade *Solanum* proposaient un modèle où un seul SLF reconnaissait une seule S-RNase (Kubo et al. 2015). Ce modèle est toujours d'actualité pour les Papaveracées et les Drupacées (Ashkani et Rees., 2016). Cependant, les récentes découvertes ont mis en évidence que pour les Maloidées et les Solanacées, le S-locus code pour plusieurs gènes de SLFs et les SLFs sont capables de reconnaître plusieurs S-RNases différentes (Ashkani et Rees., 2016). Il a été estimé que pour un individu 16 à 18 SLFs soient nécessaires pour reconnaître tous les S-allèles de S-RNases (Kubo et al. 2015). Chez *S. chilense*, 27 séquences partielles ou complètes de SLFs ont été identifiées dans le séquençage d'un seul individu (Lihua et al., 2020). Il est tout à fait probable que deux individus avec des S-allèles similaires mais avec des parents différents aient hérités de deux combinaisons différentes de SLFs. Ces différentes combinaisons ne seraient pas capables de reconnaître la même gamme de S-RNases alors qu'ils proviennent du même S-allèle.

Troisièmement, l'AIG ne s'arrête pas à la reconnaissance entre SLFs et S-RNases. De nombreux gènes modificateurs ont un rôle à jouer dans l'expression du S-locus. La régulation de ces gènes sur l'AIG n'est pas encore connue. Il est probable que des gènes modificateurs comme *Na-StEP*, *HT-A*, *HT-B* et *NaThrx* ne sont pas exprimés de la même manière dans toutes les plantes et qu'ils ont un impact sur le rejet ou non du pollen dans les différents croisements (Jiménez-Durán., 2013, Kondo et al., 2002).

En prenant en compte tous ces facteurs, il semblerait que l'AIG respecte un mécanisme de compatibilité graduel et non une logique mendélienne.

Les hybrides

Concernant les hybrides, tous portent un S-allèle fonctionnel venant de *S. chilense* SC2 (*S10* ou *S16*) et un S-allèle non fonctionnel venant de *S. lycopersicum*. Nous avons pu identifier les S-allèles de chaque individu et les croisements ont permis de confirmer l'AI des hybrides (Figure 21). Les résultats préliminaires de Leclef (2021) suggéraient en effet une AI chez les hybrides. Ce qui confirme les observations préalables de Martin (1961). La fréquence équitable des allèles *S10* et *S16* au sein de notre population d'hybrides montre que la ségrégation de ces deux allèles était bien indépendante lors de la méiose pour former le pollen de SC2 (Figure 21).

Croissance des tubes polliniques

La présence des S-allèles chez les hybrides a pu confirmer les résultats de Leclef (2021) concernant l'AIG chez les hybrides. Néanmoins, aucune expérience *in vivo* ne confirmait que les tubes polliniques des autopolinisations étaient rejetés par AIG. La croissance des tubes polliniques pour les croisements entre hybrides a permis de bien distinguer la croissance des tubes polliniques compatibles et incompatibles (Figure 22).

Pour les croisements entre hybrides, le pourcentage de tubes polliniques ne changeait pas entre un croisement compatible et un croisement auto-incompatible dans le premier tiers du style. Par contre, dans le deuxième et le troisième tiers du style, les tubes polliniques des croisements incompatibles ne continuaient pas leur croissance. Cette observation doit être cependant nuancée. Tout d'abord, nos tests χ^2 attestent qu'il existe au moins un groupe différent des autres. Néanmoins, les écarts-types des groupes sont très grands car les données relatives sont basées sur de très faibles nombres de tubes polliniques comptés. De plus, un seul tube pollinique a été trouvé dans le 2^{ème} tiers du style du croisement S16 x S16. Il est donc probable mais pas certain que ce tube pollinique en croissance soit un artéfact, une erreur de comptage ou un comptage à la limite entre le premier et le deuxième tiers. Par conséquent, les tubes polliniques venant de croisements auto-incompatibles des hybrides auraient tendance à arrêter leur croissance au premier tiers. Cette observation pourrait être une preuve irréfutable d'un comportement d'AIG des hybrides. En effet, la croissance des tubes polliniques non compatibles est arrêtée dans le premier tiers du style en cas d'AIG chez les Solanacées et les Rosacées (Thompson et Kirch., 1992).

Incompatibilité unilatérale

Règle AC x AI

Chez les *Solanum*, les croisements interspécifiques suivent généralement la règle « AC x AI » (Qin et al., 2018). Le rejet du pollen s'effectue lorsque le parent femelle est auto-incompatible (AI) et que le parent mâle est auto-compatible (AC). Néanmoins, cette règle a été découverte empiriquement dans le clade de la tomate (Tovar-Mendez et al., 2014). Plusieurs exceptions à cette règle existent. La première est que le pistil de *S. chmielewskii* (AC) n'est pas compatible avec du pollen AC ou AI. Le pistil n'est compatible qu'avec du pollen de son espèce. La deuxième est que le pollen de *Solanum lycopersicum* ne se croise pas avec les accessions AC de *S. pennelli* (Bedinger et al. 2011). Troisièmement, en opposition avec la règle « AC x AI », le laboratoire de Juan Pablo Martínez au Chili a récemment réussi à croiser *S. chilense* comme parent femelle avec *S. lycopersicum* en tant que parent mâle (JP Martinez, communication personnelle), la première étant AI et la deuxième AC.

Dans nos résultats, en regardant les différents croisements de *S. lycopersicum* avec *S. chilense* (Figure 23), les seuls croisements compatibles sont lorsque *S. lycopersicum* est utilisé comme parent femelle. En effet, seuls les tubes polliniques des croisements SL x SC2 atteignent le dernier tiers du style et pourront potentiellement féconder les ovules.

La croissance des tubes polliniques pour les croisements intra et interspécifiques entre *S. lycopersicum* et *S. chilense* a permis de distinguer des différences entre l'AI et l'IU en termes de rejet de pollen dans le style. Pour les croisements AI, l'arrêt du tube pollinique se situe au premier tiers (Figure 23 B). Aucun tube pollinique n'a été observé au deuxième ou au troisième tiers pour les croisements SC2 x SC2. Cette affirmation suit le modèle AIG des Solanaceae. Pour le croisement SL x SC2 manifestant de l'IU, l'arrêt du tube pollinique s'est fait dans le deuxième tiers (Figure 23B). Ceci suggère que les mécanismes de IU peuvent être distincts de ceux de l'AI.

Dans le clade *Lycopersicon*, les croisements interspécifiques incompatibles ne rejettent pas le pollen dans le même tiers du pistil en fonction de l'espèce. L'IU se manifeste dans le premier tiers du style dans les croisements *Solanum pennelli* x *S. lycopersicum*. A l'inverse, les croisements *Solanum chmielewskii* x *S. lycopersicum* et *Solanum habrochaites* x *S. lycopersicum* manifestent de l'IU dans le deuxième tiers du style. La position du rejet du tube pollinique dans le style en cas d'IU serait dépendante de l'espèce et non des S-RNases (Covey et al., 2010). Il est tout de même important de noter que le niveau du style où le rejet du pollen a lieu lors d'une IU chez *S. chilense* se rapproche plus de celui observé chez *Solanum chmielewskii* et *Solanum habrochaites* que de chez *Solanum pennelli*, car le rejet se situe plus dans le deuxième tiers que dans le premier tiers du style.

Chez *S. pennelli* LA0716, l'IU dépendante et l'IU indépendante des S-RNases coexistent dans la même plante. Le système d'IU de chaque membre du clade de la tomate n'est pas encore connu à ce jour (Tovar-Mendez et al., 2014). La position de l'arrêt de croissance du tube pollinique dans le style en cas d'IU pourrait aussi être dépendante des gènes participant à l'IU. Certains gènes sont présents en plusieurs copies chez certaines espèces. Par exemple, *ODC2* possède quatre copies dans le génome de *S. pennellii*, deux chez *S. chilense* et une seule pour *S. lycopersicum* (Moreels., 2022). Il est possible que le nombre de gènes et de copies aient une influence sur la position du rejet des tubes polliniques dans le style. Il est probable aussi que l'IU dépendante des S-RNases rejette les tubes polliniques dans le premier tiers du style tandis que l'IU indépendante des S-RNases les rejette dans le troisième tiers du style. Par conséquent, les gènes de l'IU indépendante des S-RNases pourraient être plus exprimés dans le troisième tiers que dans les autres tiers du style.

Les hybrides : rétrocroisements et croissance des tubes polliniques

Nos résultats pour les différents rétrocroisements entre les parents et les hybrides ont montré que l'IU existait aussi chez les hybrides (Tableau 7). Les rétrocroisements semblent suivre la règle « AC x AI ». Lorsque SC2 est croisé en tant que parent femelle avec un hybride comme parent mâle, aucun croisement ne fonctionne. Quand *S. lycopersicum* est croisé comme parent femelle avec les hybrides comme parent mâle, les croisements sont compatibles. A l'inverse, lorsqu'un hybride est croisé en tant que parent femelle avec *S. lycopersicum* comme parent mâle, aucun croisement ne fonctionne. Cette forme de rétrocroisement est la preuve que les hybrides manifestent de l'IU. Une telle IU avait déjà été mise en évidence chez les hybrides entre *S. lycopersicum* et *S. chilense* par Martin (1963).

Cependant, lorsque les hybrides sont croisés en tant que parent femelle avec SC2 comme parent mâle, la moitié des croisements fonctionne. En théorie, la règle AC x AI stipule que deux espèces AI ne sont pas capables de s'hybrider. Or, la découverte de l'AI des hybrides a été prouvée lors des expériences précédentes. Par conséquent, des hybrides AI ne devraient pas se reproduire avec un SC2 AI. Plusieurs interprétations sont possibles pour les résultats de cette combinaison de croisements :

- 1) Les hybrides devraient être considérés comme appartenant à la même espèce que les deux parents. La capacité des hybrides à pouvoir encore se reproduire avec leurs parents ne permet pas d'affirmer que les hybrides sont une espèce différente des parents. Il ne faudrait pas parler d'IU pour les croisements mais plutôt de croisements auto-incompatibles. Cette interprétation est sujette à débat car elle remet en cause la définition même de l'espèce végétale. Cependant, selon Ernst Mayr, « les espèces sont des groupes de populations réellement ou potentiellement capables de se croiser et qui sont reproductivement isolés des autres groupes ayant les mêmes propriétés » (Hörandl., 2022). En outre, la complexité de l'hybridation et de la polyploïdisation des végétaux rend cette définition difficile à appliquer en botanique (Hörandl., 2022).

- 2) L'IU étant très forte chez *S. chilense* et très faible chez *S. lycopersicum*, l'IU des hybrides devrait être intermédiaire aux deux parents. Lors d'un croisement avec *S. chilense* comme parent mâle et un hybride comme parent femelle, l'hybride est à mi-chemin entre l'AC et l'AI et est donc capable d'accepter une partie des croisements de *S. chilense*. La règle AC x AI est respectée dans cette situation.
- 3) La capacité d'un hybride à rejeter le pollen d'un parent mâle AI lors d'un rétrocroisement serait dépendante du S-allèle de l'individu. Le S-allèle aurait un impact sur le rejet du pollen dans l'IU (McClure et al., 2000). La règle AC x AI est respectée dans cette situation.

La croissance des tubes polliniques permet de mieux comprendre la nature des rétrocroisements (Figure 24). En effet, tous les tubes polliniques ont poussé dans le premier tiers du style quel que soit le croisement dans nos résultats. Cependant, les rétrocroisements (SL x S16 ou SL x S10) ont eu des pourcentages plus élevés de tubes polliniques en croissance que les autres rétrocroisements dans le premier tiers du style (Figure 24A).

Pour les deuxième tiers et troisième tiers, lorsque les hybrides étaient utilisés en tant que parent femelle avec *Solanum lycopersicum* ou *S. chilense*, le pourcentage de tubes polliniques en croissance dans le tiers dépendait du S-allèle (Figure 24B). Les rétrocroisements avec les hybrides possédant le S-allèle S16 comme parent femelle avaient des tubes polliniques en croissance dans le deuxième et le troisième tiers du style, mais pas lorsque les hybrides avaient le S-allèle S10. Il serait donc possible que les S-allèles exercent une influence sur le rejet du pollen lors de phénomènes d'IU. Il est aussi à noter que pour les rétrocroisements non compatibles, la croissance des tubes polliniques s'arrêtait dans le premier tiers du style. Ces observations sont en accord avec ce qui est connu du contrôle de l'IU chez *S. pennellii* bien que des mécanismes dépendants et indépendants des S-RNases aient été identifiés (Tovar-Mendez et al., 2014). Un système similaire pourrait être présent chez *S. chilense* et ses hybrides.

En résumé, il semblerait que le S-allèle de l'hybride exercerait une influence sur la compatibilité du croisement. Les rétrocroisements non compatibles rejetteraient le pollen dans le premier tiers du style. La différence de comportement de chaque rétrocroisement montre à quel point la nature du rejet de pollen est difficile à expliquer pour les hybrides. Les hybrides semblent être à la frontière des règles établies pour l'IU.

DIR1L

Ce n'est que récemment, lors d'un RNA-Seq cherchant des gènes liés à l'IU indépendante des S-RNases, que le gène *DIR1L* a été découvert comme intervenant dans l'IU chez *Solanum pennellii* (Muñoz-Sanz et al., 2021). La séquence de *DIR1L* appartient à la famille des *DIR1-like* qui sont des protéines aux séquences similaires à *DIR1*. Ce gène présent chez *Arabidopsis thaliana*, code pour une protéine transporteuse de lipide et qui est impliquée dans la signalisation de résistance acquise systémique (RAS) pour les feuilles distales (Champigny et al., 2013). La localisation de la protéine *DIR1* a pu être découverte par fusion transcriptionnelle avec un promoteur *GUS*. Il semblerait que *DIR1* soit exprimé dans les plantules, les poils racinaires, les feuilles, les fleurs et le phloème (Champigny et al., 2011).

L'arbre phylogénétique de *DIR1L* a pu démontrer l'existence de ce gène dans le clade *Solanum*. Ce gène existe en une seule copie dans chacun des génomes de chaque membre du clade (Figure 25). Seulement, l'arbre phylogénétique n'est pas cohérent pour *S. lycopersicum* avec les résultats de Muñoz-Sanz et al. (2021). En effet, la séquence de *DIR1L* de *S. lycopersicum* possède une délétion de 150 pb au début de sa séquence causant une faible IU (Muñoz-Sanz et al., 2021). Cependant, la séquence possédant l'ancêtre commun le plus proche est *S. chilense*

(Figure 25). La séquence de *DIR1L* chez *S. chilense* ne possède pas de délétion. De plus, cet arbre révèle une homologie de séquence forte entre *S. lycopersicum* et *S. tuberosum*. Lors de la création de l'arbre de *DIR1L*, la séquence de *S. tuberosum* avait été choisie comme outgroup par rapport aux clades des *Lycopersicon*. Sur base de cet arbre, il semble difficile de prouver que les séquences de *DIR1L* responsables d'une forte IU soient homologues entre-elles.

En revanche, la quantification de l'expression d'ARN de *DIR1L* dans les organes sexuels de *S. chilense* et *S. lycopersicum* suit la logique de Muñoz-Sanz et al., (2021). L'accumulation de la protéine DIR1L dans le pistil est corrélée avec une réponse forte de l'IU chez *S. pennellii* (Figure 26). Les résultats d'expression suggèrent également une forte IU chez *S. chilense*, une faible IU chez *S. lycopersicum* et une IU modérée chez les hybrides. La forte IU chez *S. chilense* est confirmée par les résultats de Leclef (2021) et par nos résultats de croisements entre *S. chilense* et les hybrides. Au demeurant, la haute expression de *DIR1L* dans les étamines de *S. lycopersicum* semble montrer que le rôle de ce gène n'est pas encore totalement défini.

Si l'on suppose que, par homologie de séquence, *DIR1L* possède les mêmes fonctions de transport de lipide que *DIR1* dans la signalisation de la réponse systémique acquise, alors il est possible d'affirmer qu'*ODC2* interagit directement ou indirectement avec *DIR1L* dans la voie indépendante des S-RNases de l'IU. En effet, les ornithines décarboxylases sont aussi nécessaires pour la réponse systémique acquise (Yoo et al., 2004). De plus, certaines polyamines biosynthétisées sont utilisées dans la réponse à certains stress biotiques (Yoo et al., 2004). En résumé, il serait possible que la résistance systémique acquise par les plantes ait un lien avec l'IU indépendante des S-RNases. De multiples hypothèses à ce sujet sont possibles mais le pollen d'une autre espèce pourrait être vu comme un organisme étranger devant être éliminé par des réponses moléculaires similaires à la résistance systémique acquise.

Conclusion et perspectives

Ce mémoire a permis d'approfondir les connaissances sur l'auto-incompatibilité gamétophytique et l'incompatibilité unilatérale des Solanaceae. Nous n'avons en revanche pas pu identifier de nouveaux S-allèles pour la S-RNase de *S. chilense* dans notre population. Néanmoins, nous avons pu approfondir les connaissances de la structure primaire et secondaire de celle-ci. Nous avons également pu générer pour la toute première fois une structure tri-dimensionnelle complète pour la S-RNase de *S. chilense* révélant les structures secondaires conservées ou hypervariables. Nous avons aussi pu retracer l'histoire évolutive des S-RNases de *S. chilense*.

Pour l'auto-incompatibilité gamétophytique, nous avons pu prouver génétiquement et histologiquement que les hybrides entre *S. lycopersicum* et *S. chilense* sont capables de manifester de l'auto-incompatibilité gamétophytique en rejetant, à l'aide d'une seule S-RNase fonctionnelle, les tubes polliniques avec le même S-allèle dans le premier tiers du style. Nous avons aussi pu estimer la compatibilité des individus d'une population de *S. chilense* et tenter de prédire les S-allèles de certains de ces individus.

Concernant l'incompatibilité unilatérale, nous avons pu prouver que le rejet du pollen d'un croisement interspécifique était dépendant de l'espèce et ne se produisait pas au même tiers du style qu'un croisement auto-incompatible. Nous avons aussi pu montrer que les S-allèles pouvaient avoir un impact sur le rejet du pollen lors de croisements interspécifiques. De plus, nous avons pu confirmer que les hybrides sont dotés d'incompatibilité unilatérale mais que leur réponse face aux rétrocroisements non compatibles est complexe. Finalement, nous avons pu prouver que *DIR1L* est un gène existant en une seule copie dans le clade *Lycopersicon* et la quantification du gène a pu confirmer qu'une expression forte de *DIR1L* était corrélée à une incompatibilité forte dans le clade de la tomate.

Plusieurs perspectives peuvent être imaginées pour approfondir les connaissances sur l'auto-incompatibilité et l'incompatibilité unilatérale. Tout d'abord, l'identification des S-allèles de la population du laboratoire de *S. chilense* pourrait fournir de précieux renseignements pour l'AIG. Des analyses transcriptomiques par RNA-Seq des pistils de notre population permettraient de déterminer à coup sûr le S-allèle de l'individu. Cependant, cette technique est coûteuse. Une alternative serait de faire une cinétique d'expression de la S-RNase au cours du développement de la fleur pour déterminer le temps optimal de récolte de pistil. Ainsi, les méthodes d'amplifications des S-RNases seraient beaucoup plus efficaces.

Lors de ce mémoire, le rôle des gènes modificateurs de l'auto-incompatibilité gamétophytique n'a pas été exploré. Les gènes *Na-StEP* et *NaThr* sont peu étudiés chez *S. chilense*. La génération de lignée mutantes chez *S. chilense* pour ces gènes pourrait aider à comprendre leurs rôles dans l'AIG.

L'approfondissement des connaissances des gènes exprimés dans les organes mâles lors de l'AIG pourrait permettre de compléter les pièces manquantes de la régulation. La quantification de l'expression de gènes comme *SLFs*, *Cullin1* ou *Skp1* fourniraient de précieuses informations sur la réponse du pollen face aux S-RNases. Il serait intéressant de savoir s'il existe un lien entre la capacité de reconnaissance des SLFs à reconnaître plusieurs S-RNases et l'homologie entre ces S-RNases reconnues. Des « two yeast hybrid assay » entre des SLFs et des S-RNases exprimés dans des bactéries pourraient répondre à ces questions. Lors de ces tests, il serait intéressant d'exprimer des S-RNases sans certaines régions conservées ou hypervariables. Ces tests pourraient déterminer quelles régions de la S-RNase ont pour rôle de se lier avec les SLFs.

Concernant l'incompatibilité unilatérale, il serait essentiel de pouvoir tester si des hybrides de seconde génération sont capables de manifester de l'IU dans des croisements interspécifiques

considérés comme non compatibles. Ces tests pourraient déterminer à quelle point l'IU est transmise au travers des générations.

Lors d'un croisement interspécifique, il est difficile de savoir à quel point la S-RNase impacte le rejet du tube pollinique ou non. Une cinétique d'expression de la S-RNase pourrait être faite dans des croisements non viables afin de mieux comprendre l'impact de la voie dépendante des S-RNases. En effet, on ne connaît pas le moment où la S-RNase est exprimée lors d'un croisement entre deux espèces.

Finalement, il serait aussi intéressant de comprendre le potentiel lien entre la résistance systémique acquise des plantes, les polyamines et l'incompatibilité unilatérale. Le rôle de *DIR1L* dans la régulation devrait être approfondi car l'intérêt de faire du transport de lipide avec une protéine pour rejeter des tubes polliniques reste encore un mystère à ce jour.

Bibliographie

- Ali, M. Y., Sina, A. A. I., Khandker, S. S., Neesa, L., Tanvir, E. M., Kabir, A., ... & Gan, S. H. (2020). Nutritional composition and bioactive compounds in tomatoes and their impact on human health and disease: A review. *Foods*, 10(1), 45. <https://doi.org/10.3390/foods10010045>
- Ashkani, J., & Rees, D. J. G. (2016). A comprehensive study of molecular evolution at the self-incompatibility locus of Rosaceae. *Journal of Molecular Evolution*, 82(2), 128-145. <https://doi.org/10.1007/s00239-015-9726-4>
- Asins, M. J., Villalta, I., Aly, M. M., Olías, R., Álvarez De Morales, P., Huertas, R., Li, J., Jaime-Pérez, N., Haro, R., Raga, V., Carbonell, E. A., & Belver, A. (2013). Two closely linked tomato HKT coding genes are positional candidates for the major tomato QTL involved in Na⁺/K⁺ homeostasis. *Plant, Cell & Environment*, 36(6), 1171-1191. <https://doi.org/10.1111/pce.12051>
- Bedinger, P. A., Chetelat, R. T., McClure, B. et al. Interspecific reproductive barriers in the tomato clade: opportunities to decipher mechanisms of reproductive isolation. *Sex Plant Reprod* 24, 171–187 (2011). <https://doi.org/10.1007/s00497-010-0155-7>
- Brisolara-Corrêa, L., Thompson, C. E., Fernandes, C. L., & de Freitas, L. B. (2015). Diversification and distinctive structural features of S-RNase alleles in the genus *Solanum*. *Molecular Genetics and Genomics*, 290(3), 987-1002.
- Brog, Y. M., Osorio, S., Yichie, Y., Alseekh, S., Bensal, E., Kochevenko, A., ... & Fernie, A. R. (2019). A *Solanum neorickii* introgression population providing a powerful complement to the extensively characterized *Solanum pennellii* population. *The Plant Journal*, 97(2), 391-403. <https://doi.org/10.1111/tpj.14095>
- Çakır, Özgür (2016). Genetically Modified Organisms in Food || Detection of Genetically Modified Organisms in Feed., (), 207–222. doi:10.1016/b978-0-12-802259-7.00019-1
- Champigny, M. J., Isaacs, M., Carella, P., Faubert, J., Fobert, P. R., & Cameron, R. K. (2013). Long distance movement of *DIR1* and investigation of the role of *DIR1-like* during systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *Frontiers in plant science*, 4, 230. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00230>
- Champigny, M. J., Shearer, H., Mohammad, A., Haines, K., Neumann, M., Thilmony, R., ... & Cameron, R. K. (2011). Localization of DIR1 at the tissue, cellular and subcellular levels during Systemic Acquired Resistance in *Arabidopsis* using DIR1: GUS and *DIR1*: EGFP reporters. *BMC plant biology*, 11(1), 1-16. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-125>
- Chen, W. V., & Soriano, P. (2003). Gene trap mutagenesis in embryonic stem cells. *Methods in enzymology*, 365, 365-386. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(03\)65026-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(03)65026-3)
- Covey, P. A., Kondo, K., Welch, L., Frank, E., Sianta, S., Kumar, A., ... & Bedinger, P. A. (2010). Multiple features that distinguish unilateral incongruity and self-incompatibility in the tomato clade. *The Plant Journal*, 64(3), 367-378. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04340.x>
- Ephytia – *Solanum lycopersicum*. Accès en ligne le 28 septembre 2022, <http://ephytia.inra.fr/fr/C/5299/Tomate-L-espece-et-sa-biologie#:~:text=Apr%C3%A8s%20germination%20et%20apparition%20de,formeront%20a vant%20une%20nouvelle%20inflorescence>.
- FAO. 2021. Fruits et légumes – éléments essentiels de ton alimentation. Année internationale des fruits et des légumes, 2021 Note d'information. Rome. <https://doi.org/10.4060/cb2395fr>

- Fernandes, M. D. O., Bianchi, P. A., Silva, L. R. A. D., Vianna, L. S., Santos, E. A., & Moulin, M. M. (2018). Morpho-agronomic characterization and analysis of genetic divergence among accessions of tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.). *Ciência Rural*, 48. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180433>.
- Fujii, S., Kubo, K. I., & Takayama, S. (2016). Non-self-and self-recognition models in plant self-incompatibility. *Nature Plants*, 2(9), 1-9. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.130>
- Fulton, T. M., Chunwongse, J., & Tanksley, S. D. (1995). Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant molecular biology reporter*, 13(3), 207-209. <https://doi.org/10.1007/BF02670897>
- Gerszberg, A., Hnatuszko-Konka, K., Kowalczyk, T., & Kononowicz, A. K. (2015). Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the service of biotechnology. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 120(3), 881-902. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0664-4>
- Gilgenkrantz, S. (2012). Histoire de la tomate à travers son génome. *médecine/sciences*, 28(11), 1000-1002. <https://doi.org/10.1051/medsci/20122811022>
- Harrison, R. G., & Larson, E. L. (2014). Hybridization, introgression, and the nature of species boundaries. *Journal of Heredity*, 105(S1), 795-809. <https://doi.org/10.1093/jhered/esu033>
- Hindorf, H., & Omondi, C. O. (2011). A review of three major fungal diseases of *Coffea arabica* L. in the rainforests of Ethiopia and progress in breeding for resistance in Kenya. *Journal of advanced research*, 2(2), 109-120. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2010.08.006>
- Hörandl, E. (2022). Novel approaches for species concepts and delimitation in polyploids and hybrids. *Plants*, 11(2), 204. <https://doi.org/10.3390/plants11020204>
- Igic, B., Smith, W., Robertson, K. *et al.* Studies of self-incompatibility in wild tomatoes: I. S-allele diversity in *Solanum chilense* Dun. (Solanaceae). *Heredity* 99, 553–561 (2007). <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6801035>
- Ioerger, T.R., Gohlke, J.R., Xu, B. *et al.* Primary structural features of the self-incompatibility protein in solanaceae. *Sexual Plant Reprod* 4, 81–87 (1991). <https://doi.org/10.1007/BF00196492>
- Jiménez-Durán, K., McClure, B., García-Campusano, F., Rodríguez-Sotres, R., Cisneros, J., Busot, G., & Cruz-García, F. (2013). *NaStEP*: a proteinase inhibitor essential to self-incompatibility and a positive regulator of HT-B stability in *Nicotiana glauca* pollen tubes. *Plant physiology*, 161(1), 97-107. <https://doi.org/10.1104/pp.112.198440>
- Kashyap, S. P., Kumari, N., Mishra, P., Moharana, D. P., & Aamir, M. (2021). Tapping the potential of *Solanum lycopersicum* L. pertaining to salinity tolerance: perspectives and challenges. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 68(6), 2207-2233. <https://doi.org/10.1007/s10722-021-01174-9>
- Kondo, K., Yamamoto, M., Matton, D. P., Sato, T., Hirai, M., Norioka, S., ... & Kowiyama, Y. (2002). Cultivated tomato has defects in both S-RNase and HT genes required for stylar function of self-incompatibility. *The Plant Journal*, 29(5), 627-636. <https://doi.org/10.1046/j.0960-7412.2001.01245.x>
- Knapp, S., & Peralta, I. E. (2016). The tomato (*Solanum lycopersicum* L., Solanaceae) and its botanical relatives. In *The tomato genome* (pp. 7-21). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-53389-5_2

- Kubo, K. I., Paape, T., Hatakeyama, M., Entani, T., Takara, A., Kajihara, K., ... & Takayama, S. (2015). Gene duplication and genetic exchange drive the evolution of S-RNase-based self-incompatibility in *Petunia*. *Nature Plants*, 1(1), 1-9. <https://doi.org/10.1038/nplants.2014.5>
- Leclef, Claire. Impact d'un stress salin sur la croissance, la reproduction et la physiologie d'hybrides de tomates entre *Solanum chilense* et *Solanum lycopersicum*. Faculté des sciences, Université catholique de Louvain, 2021. Prom. : Quinet, Muriel
- Leelatanawit, R., Saetung, T., Phuengwas, S., Karoonuthaisiri, N., & Devahastin, S. (2017). Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in postharvest tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) treated by continuous low-voltage direct current electricity to increase secondary metabolites. *International Journal of Food Science & Technology*, 52(9), 1942-1950. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13477>
- Liao, J., Wei, X., Chen, Z., Qin, X., Pan, Z., Niu, Y., Suo, W., Zheng, Y., Ma, W., & Chen, S. (2020). Research on the regulatory mechanisms of self-incompatibility plasticity in *Nicotiana glauca*. *Euphytica*, 216(9), 149. <https://doi.org/10.1007/s10681-020-02687-7>
- Li, J., Pu, L., Han, M., Zhu, M., Zhang, R., & Xiang, Y. (2014). Soil salinization research in China: advances and prospects. *Journal of Geographical Sciences*, 24(5), 943-960. <https://doi.org/10.1007/s11442-014-1130-2>
- Li, W., & Chetelat, R. T. (2014). The role of a pollen-expressed Cullin1 protein in gametophytic self-incompatibility in *Solanum*. *Genetics*, 196(2), 439-442. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.158279>
- Li, W., & Chetelat, R. T. (2015). Unilateral incompatibility gene *ui1.1* encodes an S-locus F-box protein expressed in pollen of *Solanum* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(14), 4417-4422. <https://doi.org/10.1073/pnas.142330111>
- Lippman, Z. B., Semel, Y., & Zamir, D. (2007). An integrated view of quantitative trait variation using tomato interspecific introgression lines. *Current opinion in genetics & development*, 17(6), 545-552. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2007.07.007>
- Martin, F. W. The Inheritance of Self-Incompatibility in Hybrids of *Lycopersicon esculentum* Mill. x *L. chilense* Dun. *Genetics* 46, 1443–1454 (1961).
- McClure, B. A., Cruz-Garcia, F., Beecher, B., & Sulaman, W. (2000). Factors affecting inter- and intra-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Annals of Botany*, 85(suppl_1), 113-123. <https://doi.org/10.1006/anbo.1999.1061>
- Moreels, Pauline. *Etude des barrières de reproduction entre Solanum chilense et Solanum lycopersicum*. Faculté des sciences, Université catholique de Louvain, 2022. Prom. : Quinet, Muriel.
- Muñoz-Sanz, J. V., Tovar-Méndez, A., Lu, L., Dai, R., & McClure, B. (2021). A Cysteine-Rich Protein, SpDIR1L, Implicated in S-RNase-Independent Pollen Rejection in the Tomato (*Solanum* Section *Lycopersicon*) Clade. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 13067. https://doi.org/10.3390/ijms2223_13067
- Natalie Luhtala; Roy Parker (2010). *T2 Family ribonucleases: ancient enzymes with diverse roles*. , 35(5), 253–259. doi:10.1016/j.tibs.2010.02.002
- Paape, T., & Kohn, J. R. (2011). Differential strengths of selection on S-RNases from *Physalis* and *Solanum* (Solanaceae). *BMC Evolutionary Biology*, 11(1), 243. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-243>

- Peralta, I. E., Spooner, D. M., & Knapp, S. (2008). Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (Solanum sect. Lycopersicoides, sect. Juglandifolia, sect. Lycopersicon; Solanaceae). *Systematic botany monographs*, 84. DOI:10.2307/25027972.
- Pérez de Castro, A., Julián, O., & Díez, M. J. (2013). Genetic control and mapping of *Solanum chilense* LA1932, LA1960 and LA1971-derived resistance to Tomato yellow leaf curl disease. *Euphytica*, 190(2), 203-214. <https://doi.org/10.1007/s10681-012-0792-z>
- Picken, A. J. F., Stewart, K., Klapwijk, D. (1986). Germination and vegetative development. In: Atherton, J.G., Rudich, J. (eds) *The Tomato Crop*. The Tomato Crop. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-009-3137-4_3
- Qin, X., Li, W., Liu, Y., Tan, M., Ganai, M., & Chetelat, R. T. (2018). A farnesyl pyrophosphate synthase gene expressed in pollen functions in S-RNase-independent unilateral incompatibility. *The Plant Journal*, 93(3), 417-430. <https://doi.org/10.1111/tpj.13796>
- Quinet, M., & Kinet, J. M. (2007). Transition to flowering and morphogenesis of reproductive structures in tomato. *Int. J. Plant Dev. Biol*, 1, 64-74.
- Raduski, A. R., & Igić, B. (2021). Biosystematic studies on the status of *Solanum chilense*. *American journal of botany*, 108(3), 520-537. <https://doi.org/10.1002/ajb2.1621>
- Raspé, O., Kohn, J. R. Population structure at the S-locus of *Sorbus aucuparia* L. (Rosaceae: Maloideae). *Mol. Ecol.*, 16 (2007), pp. 1315-1325
- Rezk, A., Abhary, M., & Akhkha, A. (2021). Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Breeding Strategies for Biotic and Abiotic Stresses. In *Advances in Plant Breeding Strategies: Vegetable Crops* (pp. 363-405). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-66961-4_10
- Richman, A. D., Kao, T. H., Schaeffer, S. W., & Uyenoyama, M. K. (1995). S-allele sequence diversity in natural populations of *Solanum carolinense* (Horsenettle). *Heredity*, 75(4), 405-415. <https://doi.org/10.1038/hdy.1995.153>
- Richman, A. D., Kohn, J.R. (2000). Evolutionary genetics of self-incompatibility in the Solanaceae. In: Doyle, J.J., Gaut, B.S. (eds) *Plant Molecular Evolution*. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-011-4221-2_8
- Rick, C. M., & Lamm, R. (1955). Biosystematic studies on the status of *Lycopersicon chilense*. *American Journal of Botany*, 663-675. <https://doi.org/10.2307/2485327>
- Rubio, F., Alonso, A., García-Martínez, S., & Ruiz, J. J. (2016). Introgression of virus-resistance genes into traditional Spanish tomato cultivars (*Solanum lycopersicum* L.): Effects on yield and quality. *Scientia horticulturae*, 198, 183-190. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.11.025>
- Saito, T., Ariizumi, T., Okabe, Y., Asamizu, E., Hiwasa-Tanase, K., Fukuda, N., ... & Ezura, H. (2011). TOMATOMA: a novel tomato mutant database distributing Micro-Tom mutant collections. *Plant and cell physiology*, 52(2), 283-296. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr004>
- Sato, S., Tabata, S., Hirakawa, H., Asamizu, E., Shirasawa, K., Isobe, S., ... & Fernandez-Munoz, R. (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, 485(7400), 635-641. <http://dx.doi.org/10.1038/nature11119>
- Shibata, D. (2005). Genome sequencing and functional genomics approaches in tomato. *Journal of General Plant Pathology*, 71(1), 1-7. <https://doi.org/10.1007/s10327-004-0150-7>

- Silva, N. F., & Goring, D. R. (2001). Mechanisms of self-incompatibility in flowering plants. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 58(14), 1988-2007. <https://doi.org/10.1007/PL00000832>
- Sim, S. C., Robbins, M. D., Van Deynze, A., Michel, A. P., & Francis, D. M. (2011). Population structure and genetic differentiation associated with breeding history and selection in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Heredity*, 106(6), 927-935. <https://doi.org/10.1007/PL00000832>
- Tao, R., & Iezzoni, A. F. (2010). The S-RNase-based gametophytic self-incompatibility system in *Prunus* exhibits distinct genetic and molecular features. *Scientia Horticulturae*, 124(4), 423-433. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.01.025>
- Takayama, Seiji; Isogai, Akira (2005). *SELF-INCOMPATIBILITY IN PLANTS. Annual Review of Plant Biology*, 56(1), 467- 489. doi:10.1146/annurev.arplant.56.032604.144249
- Tapia, G., Méndez, J., & Inostroza, L. (2016). Different combinations of morpho-physiological traits are responsible for tolerance to drought in wild tomatoes *Solanum chilense* and *Solanum peruvianum*. *Plant Biology*, 18(3), 406-416. <https://doi.org/10.1111/plb.12409>
- Thompson, R. D., & Kirch, H. H. (1992). The S locus of flowering plants: when self-rejection is self-interest. *Trends in Genetics*, 8(11), 381-387. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(92\)90299-J](https://doi.org/10.1016/0168-9525(92)90299-J)
- Thorn, A., Steinfeld, R., Ziegenbein, M., Grapp, M., Hsiao, H. H., Urlaub, H., ... & Krätzner, R. (2012). Structure and activity of the only human RNase T2. *Nucleic acids research*, 40(17), 8733-8742. <https://doi.org/10.1093/nar/gks614>
- Tovar-Méndez, A., Kumar, A., Kondo, K., Ashford, A., Baek, Y. S., Welch, L., ... & McClure, B. A. (2014). Restoring pistil-side self-incompatibility factors recapitulates an interspecific reproductive barrier between tomato species. *The Plant Journal*, 77(5), 727-736. <https://doi.org/10.1111/tpj.12424>
- Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., & Leunissen, J. A. M. (2007). Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research*, 35(suppl_2), W71-W74. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm306>
- Williams, J. S., Wu, L., Li, S., Sun, P., & Kao, T.-H. (2015). Insight into S-RNase-based self-incompatibility in *Petunia*: Recent findings and future directions. *Frontiers in Plant Science*, 6, 41. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00041>
- Wu, L., Williams, J. S., Sun, L., & Kao, T. H. (2020). Sequence analysis of the *Petunia inflata* S-locus region containing 17 S-Locus F-Box genes and the S-RNase gene involved in self-incompatibility. *The Plant Journal*, 104(5), 1348-1368. <https://doi.org/10.1111/tpj.15005>
- Wright, S. (1939). The Distribution of Self-Sterility Alleles in Populations. *Genetics*, 24(4), 538-552. DOI : 10.1093/genetics/24.4.538
- Yoo, T. H., Park, C. J., Ham, B. K., Kim, K. J., & Paek, K. H. (2004). Ornithine decarboxylase gene (CaODC1) is specifically induced during TMV-mediated but salicylate-independent resistant response in hot pepper. *Plant and cell physiology*, 45(10), 1537-1542. <https://doi.org/10.1093/pcp/pch176>
- Zhao, H., Zhang, Y., Zhang, H., Song, Y., Zhao, F., Zhang, Y. E., ... & Xue, Y. (2022). Origin, loss, and regain of self-incompatibility in angiosperms. *The Plant Cell*, 34(1), 579- 596. <https://doi.org/10.1093/plcell/koab266>

Annexes

Annexe S1 : Listes des séquences consensus utilisés pour la formation des amorces des S-allèles

Amorce S10 F: GACCTTTTGACAACCTCTCCGG

Amorce S10 R: CCCGATGCAACAAAGGTGAT

H9B	TTGATTTCATGGTTTGTGGCCAGATAATGAGAACAACGTGCTGAATAACTGCAAGCCTAAA	60
Pis9	-----GGATTGTGGGCTGATAATGAGAACAACGTGCTGAATAACTGCAAGCCTAAA	51
	*** **	
H9B	TCTTACAAAGATATAAGGGATTTGCCCATTCAAAACAAGATATACGATCGCTGGCCTGAC	120
Pis9	TCTTACAAAGATATAAGGGATTTGCCCATTCAAAACAAGATATACGATCGCTGGCCTGAC	111

H9B	TTGAAAAGAGCAAAGTGGTTGTGTATGAAAGATCAAGAGTTCTGGCGACATGAATTTAAT	180
Pis9	TTGAAAAGAGCAAAGTGGTTGTGTATGAAAGATCAAGAGTTCTGGCGACATGAATTTAAT	171

H9B	AAGCATGGATCGTGCAGCATGGACAGATACGATCAAAAAGCATATTTTCGATTTAGCTATA	240
Pis9	AAGCATGGATCGTGCAGCATGGACAGATACGATCAAAAAGCATATTTTCGATTTAGCTATA	231

H9B	AATTTAAAGGACAAGTTTGACCTTTTGACAACCTCTCCGGAACATAGAATTTATCCTGGA	300
Pis9	AATTTAAAGGACAAGTTTGACCTTTTGACAACCTCTCCGGAACATAGAATTTATCCTGGA	291

H9B	TTTCGTTTATACTGTTAAAGAAATTGGGGATGCTATCAAAACAGTTACGACGGTTTATCCA	360
Pis9	TTTCGTTTATACTGTTAAAGAAATTGGGGATGCTATCAAAACAGTTACGACGGTTTATCCA	351

H9B	AACATGAAGTGCACCTGGTAATTCTGCAGGACAAATGGTACTATTAGAAATCGGGATATGC	420
Pis9	AACATGAAGTGCACCTGGTAATTCTGCAGGACAAATGGTACTATTAGAAATCGGGATATGC	411

H9B	TTTCGACCCCGATGCAACAAAGGTGATTCCTTGTCATCGACCTTTGATATGTCATAAAGAT	480
Pis9	TTTCGACCCCGATGCAACAAAGGTGATTCCTTGTCATCGACCTTTGATATGTCATAAAGAT	471

H9B	GAAACCGAGAAGATTGATTTTCCACAATGAGTAACTTCATAATTTTTTTTAATTTTTGT	540
Pis9	GAAACCGAGAAGATTGATTTTCCACAATGAGTAACTTCATAATTTTTTTTAATTTTTGT	531

H9B	TTCTGCATTTTGCTAAGCATACTTAAAGCTTAACCTATATGGTGATAAAGATTATGAAGC	600
Pis9	TTCTGCATTTTGCTAAGCATACTTAAAGCTTAACCTATATGGTGATAAAGATTATGAAGC	591

H9B	TATAAAATTTCCACCAAGACAAAAAAGTACTAGTCGACGCGTGCGC--	658
Pis9	TATAAAATTTCCACCAAAAAAAGTACTAGTCGACGCGTGCGC--	651
	***** * * *	
H9B	-----	658
Pis9	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	711

H9B	-----	658
Pis9	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	771

H9B	-----	658
Pis9	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	802

Primer S16 F: ACGCAATCATGACCGTTACG

Primer S16 R: TGCTTTCAATTGACCTCGGC

PIS9	-----TCGAGGCAGCTAAATTACTGTGACCGCCAGGCTACT	36
H13B	CATGGTTTATGGCCGATAATCACTCGAGGCAGCTAAATTACTGTGACCGCCAGGCTACT	60

PIS9	TTTGTGACGTCCCGATAGGCAAGAACTCGGTGATCTAGACAAGCGATGGCCTCAATTG	96
H13B	TTTGTGACGTCCCGATAGGCAAGAACTCGGTGATCTAGACAAGCGATGGCCTCAATTG	120

PIS9	AAACACAGTAAGAAATATGGTGAGGAAGCGCAGCCTCATTGGAGAGAAGAATTCATGAAG	156
H13B	AAACACAGTAAGAAATATGGTGAGGAAGCGCAGCCTCATTGGAGAGAAGAATTCATGAAG	180

PIS9	CATGGAACGTGTTGTAAGAATCTATACAACGAAGAACAATACTTTGATCTAGCTATGAAC	216
H13B	CATGGAACGTGTTGTAAGAATCTATACAACGAAGAACAATACTTTGATCTAGCTATGAAC	240

PIS9	TTGATAGACAGGTTTGATATTTTGAGAATACTTGGATATCAGGGGATTATCCCTGGAAT	276
H13B	TTGATAGACAGGTTTGATATTTTGAGAATACTTGGATATCAGGGGATTATCCCTGGAAT	300

PIS9	TCTTACATCGTTCAGAAGGTTCAACACGCAATCATGACCGTTACGCATAATCTTCCTAAG	336
H13B	TCTTACATCGTTCAGAAGGTTCAACACGCAATCATGACCGTTACGCATAATCTTCCTAAG	360

PIS9	CTCCAGTGCCTTGAGAGTTCTCTTGGATTTGAACTAAGTGAGGTAGTTATATGTTTCGAT	396
H13B	CTCCAGTGCCTTGAGAGTTCTCTTGGATTTGAACTAAGTGAGGTAGTTATATGTTTCGAT	420

PIS9	ACNACGGGTAAGTATGTGGTTAGTTGTCGTAACCTTGGGACATGCTTCAATAAAGGAACT	456
H13B	ACGACGGGTAAGTATGTGGTTAGTTGTCGTAACCTTGGGACATGCTTCAATAAAGGAACT	480
	** *****	
PIS9	ATGTCATTGATTAAGTTTCGCCGATAAAATAGCTGTGCATTTCTTCTGTTATCTTGCTTT	516
H13B	ATGTCATTGATTAAGTTTCGCCGATAAAATAGCTGTGCATTTCTTCTGTTATCTTGCTTT	540

PIS9	CAATTGACCTCGGCTTGT-----	534
H13B	CAATTGACCTCGGCTTGTAAAGTTAAAAATCAATCTTCTATAGTACAAGTACATCAACAA	600

PIS9	-----	534
H13B	ATGTATTATGCTGGAGCCGCCATAATGGTAAATTCTATTCTTGGTTGTCAAAAAAAAAA	660
PIS9	-----	534
H13B	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	720
PIS9	-----	534
H13B	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	754

Annexe S2 : Alignement des S-RNases de chaque S-allèle connu pour *S. chilense*

S30_Solanum_chilense	CAATACTGCAAGCCAA-----AGCCTACGTTTCGATCCATGCAGGATCAAATGCTTGAT	114
S3_Solanum_chilense	CAATACTGCAAGCCAA-----AACCTAAGTTTAGATTGATCAAGGATCAGCTGCTTGAT	114
S21_Solanum_chilense	CAATACTGTAAGCCGA-----AACCTACATTTATATACATCAAGGATCAGATGTTGAT	114
S22_Solanum_chilense	CAAAACTGCAAGCCAA-----AACTTACATATACAAATTTCAAGGATAAGATGTTTCGAC	114
S5_Solanum_chilense	CAGAACTGCAAGCCAA-----AACTTAAGTATGTAAATTTCAAGGATATGATGTTCAAC	72
S1_Solanum_chilense	CAGCAGTGCAAGCCAA-----AACCTAATTATGTAAATTTCAAGGATAAGATGTTGAAC	114
S14_Solanum_chilense	CAGCAATGCAAAACCA-----AACCTGATTATGTCAATTTCAAGGATAAGATGTTCAAC	72
S13_Solanum_chilense	CATTTACAATTCTGCACCTCTGAGAAGTATGAAATTTTTGAACCGGGTAGTGTACTCGAT	66
S18_Solanum_chilense	CATTTACAATTCTGCACCTCTGAGAAGTATGAAATTTTTGAACCGGGTAATGTACTCGAT	120
S19_Solanum_chilense	GAGTTCTGCACTGGCGTTACTAAGTTTAACTCTTTTCAGTCTAAAAGACAGTATAGTCAAT	120
S20_Solanum_chilense	GAGTTCTGCTCCGGCGGTAAAGCGTATAAGAAATTTGAACTACAGATCATATAGTCAAT	120
S17_Solanum_chilense	AATAACTGTGATCCCAAT-----CTTAACATATCGGATCATCCCGGAGGTGAGAAA	111
S6_Solanum_chilense	AATAAATGCAATCCCGAT-----GCTAAATATGCCCTCTGTACGGGCG---GTAAG	108
S8_Solanum_chilense	AATAAATGCAATCCCGAT-----GCTAGCTATACACTGTGTACGGGCG---ATAAG	87
S34_Solanum_chilense	AATTACTGTAATCGCAAA-----GCTCTATATACTAGTCTCAGGATG---AAATA	108
S2_Solanum_chilense	AATTTTTGTAATCCGAGA-----GCTTCGTATACTATTGTGTCAGGCATG---GAACA	108
S25_Solanum_chilense	AGTTTCTGTGATCCCGAA-----GCTAAGTATACTATTGTGTCAGGCATG---AAGAA	69
S32_Solanum_chilense	TATGACTGTGATCCCGTA-----AAAAAGTATAAAACAATAGATACATAAATA	108
S29_Solanum_chilense	AATGACTGTTATCCAAAG-----AAAAAGTTTACAAATATAAAGGATAAAGCTACA	111
S33_Solanum_chilense	TATGACTGTAATCCAAAT-----AAAGAGTTTAAAAAAATATATGACAAACATCTA	111
S26_Solanum_chilense	AATTACTGCTCATCCGAA-----GATGAGTATGAGGATATCAGGATATTCTATAA	111
S15_Solanum_chilense	ATTAACTGCCCGGCCAAA-----GAGAGCTACAAAAGTATTACGGACTCTAAGAAA	111
S27_Solanum_chilense	AATAACTGTGATTCTGAT-----GACGACTATAAAGCTATCATGAACCGGAATATG	111
S28_Solanum_chilense	AATGACTGTGGTTCTGGC-----GACGATTATGATGATATTCGGGATGCCCATATG	96
S7_Solanum_chilense	TATGACTGCGATGTACCCCTGAGGT---AGATTACGTTTCAGATCAGGATCATAGATA	117
S11_Solanum_chilense	AATAACTGCAATTTTGCCAAAAAGAAGATCGTTACACTAAGATCAGGATCCAAAAA	120
S31_Solanum_chilense	AATTTTTGT---GGCGGT-----AACCAGTATAAGACTATCGAAGTTGGCGATAA	105
S9_Solanum_chilense	AATCATTGCAGTACCAGT-----ACAACGTTTAAACAGATCAGCGGATAAATAA	90
S16_Solanum_chilense	AATTT---CTGCAAGAGT-----ACTAAGTATATCAAGAGCGCGGATGAAGGTAAA	108
S4_Solanum_chilense	AATTACTGTGGACGTAAAAAG-----GATAACTATAAAATATGACGGATGATCGGGA	114
S10_Solanum_chilense	AATAACTGCAAGCCTAA-----ATCTTACAAAGATATAAGGGATTGTCCTATT	87
S23_Solanum_chilense	AATGATTGTACGGTCG-----AATGTATACTACTATAGAGCTTCCCGGTGAA	108
S12_Solanum_chilense	AATAACTGCAGAAATCA-----TGCTTATATTGCATTAAACGAATGTCCGTGAG	66
S24_Solanum_chilense	AATGACTGCAAAATATA-----GGCATATAAAAAATTAAAGGATGTACATGAG	108
S30_Solanum_chilense	ATAGCTCCAAAAAACTTTACCATTACAGGGCTGTGGCCGGACAAAGAGGGAACATGCTG	60
S3_Solanum_chilense	ATAGCTCCAAAAAACTTTACCATTACAGGGCTTTGGCCGGACAAAGAGGGAACATGCTG	60
S21_Solanum_chilense	ATAGCTCCAAAAAACTTTACCATTACAGGGCTTTGGCCGGACAAAGAGGGAACATGCTG	60
S22_Solanum_chilense	CTTACTCCAAAGAACTTTACAGATTACAGGGCTTTGGCCAGATAAAGAGGGAACATGCTG	60
S5_Solanum_chilense	-----AAACAGGGAACATGCTG	18
S1_Solanum_chilense	ATAGCTCCAAAAAACTTTACAGATTACAGGGCTTTGGCCGTGATAAAGAGGGAACATGCTG	60
S14_Solanum_chilense	-----AAAGAGGGAACATGCTG	18
S13_Solanum_chilense	-----CCCGGC	6
S18_Solanum_chilense	ATACCTCCGAACAACCTTACAGATTATGCGGCTTTGGCCGGATAAGATGGGTATACCCGGC	60
S19_Solanum_chilense	AGAACGGCTAATAACTTTACGATTACAGGGCTTTGGCCGTGAAAAAGAGGACTTTGCTGATG	60
S20_Solanum_chilense	AGAACATCGAACAAATTTACAGATTACAGGCTTTGGCCCGAGAGAAGAGGGTTTCGTCTG	60
S17_Solanum_chilense	CCAGTTCCCGACAACCTTCACAATTCATGGTCTTTGGCCAGATAACAAATCCATACGTCGT	60
S6_Solanum_chilense	AGAACTCCGAACAACCTTTACAATCCAGGGCTATGGCCGGATATAAAGGGGCACAATCTT	60
S8_Solanum_chilense	-----ATTCATGGCTTCTGGCCGGACATAAAGGCACAGTTCTT	39
S34_Solanum_chilense	AGAATCCCAAATTTACTTACAATCCATGGACTTTGGCCGGATAGCCAGGGTGGAGAAGCTG	60
S2_Solanum_chilense	AGAACTCCAAAGGACTTTACAATCCATGGGCTTTGGCCGGATAGCGAAGCTGGAGAAGCTG	60
S25_Solanum_chilense	-----GATAGCAAGGGACGAGAAGCTG	21
S32_Solanum_chilense	---ATTCCAAACAACCTTTACCATTATGAGTTTGGCCAGATCACACCTCCTTCGTCATG	57
S29_Solanum_chilense	CCTATTCCGAAAAAATTTACCATTATGAGTTTGGCCGGATCACACCGGATTTGCTCATG	60
S33_Solanum_chilense	CCTATTCCGAAAAAATTTACCATTATGAGTTTGGCCGGATCACACCGGATTTGCTCATG	60
S26_Solanum_chilense	CTAATTTCCAAAAAATTTACAATTCATGGGCTTTGGCCGTGATAAGCAGAAGCAATGCTG	60
S15_Solanum_chilense	CCAGTTCCAAAGAACTTTACAGATCCATGGGCTATGGCCGTGATAAAGAGAAATTTGCGG	60
S27_Solanum_chilense	CCACTTCCAAACTACTTTACAATCCATGGGCTTTGGCCAGATAACAGAGTAAAAATGCTG	60
S28_Solanum_chilense	-----TTTACCATTCCATGGGCTTTGGCCAGATAGCAAGGGTAAAAATGCTG	45
S7_Solanum_chilense	CCAAATCCAAAGAAATTTACGATTACAGGGCTTTGGCCGGATAACAGGTCACAAATCTG	60
S11_Solanum_chilense	CCAAATCCAAATAATTTTACGATTACAGGGCTTTGGCCGGATAACAGTCCGTAATACTG	60
S31_Solanum_chilense	---ACTCCAAACAACCTTTACAATCCATGGGCTTTGGCCGGATAACAGGCAACCGGCTA	57
S9_Solanum_chilense	-----ATTCATGGGTTGTGGCCGGATAAAGAGCACACGGCTG	39
S16_Solanum_chilense	CGAACTCCAAAGCAACTTTACAATCCATGGGCTTTGGCCGTGATAACAGAGTAGACGGCTG	60
S4_Solanum_chilense	GAAACTCCAAAAAATTTACAATCCATGGACTTTGGCCAGATAACGTGAGTACAGAGCTT	60
S10_Solanum_chilense	-----ATTCATGGGCTGTGGCCGGATAAAGAGCAACAGCTGCTG	39
S23_Solanum_chilense	AGAATTCATTGAACCTTACAATCCATGGGCTTTGGCCGTGATAAAGAGCAACATGTTG	60
S12_Solanum_chilense	-----AACGAGAAATACTTCCTG	18
S24_Solanum_chilense	AGAATTCACCGGAACCTTACAGTCCATGGGTTGTGGCCGGATAACAAACCAATACAGCTG	60

S30_Solanum_chilense	GATCTT-----GACAAGAACTGGATTTCAGTTGAAGTATACACAAATTTATGGTCGAGAT	168
S3_Solanum_chilense	GATCTT-----GACAAGAACTGGATTTCAGTTGAAGTATCCACAATCTCATGTCGAAAT	168
S21_Solanum_chilense	GATCTT-----GACAAGAACTGGATTTCAGTTGAAGTATCCACAATATATGTCGAGAT	168
S22_Solanum_chilense	GATCTT-----GACAAGAACTGGATTTCAGTTAAAGTTTAATAAATATTATGGTAAAAAG	168
S5_Solanum_chilense	GATCTT-----GACAAAAACTGGATTTCAGTTGAAGTTTGATGAAGATTATGGTAAAGAC	126
S1_Solanum_chilense	GATCTT-----GACAAAAACTGGATTTCAGTTGAAGTTTGATGAAGACTATGGTAGAGAT	168
S14_Solanum_chilense	GATCTT-----GACAAAAACTGGATTTCAGTTGAAGTATGATAAAGATTATGGTAGAAAC	126
S13_Solanum_chilense	GCTCTG-----GACCAGCACTGGATTTCAGTTGAAGTTTGAACGCGAAACAGGACTCCGT	120
S18_Solanum_chilense	GCTCTG-----GACCAGCACTGGATTTCAGTTGAAGTTTGAACGCGAAACAGGAATTCGT	174
S19_Solanum_chilense	GATCTGGAGAAGGAACACCATTTGGATTCAATTGAAGTTTCGATGAACAATTCGCCAGGAAT	180
S20_Solanum_chilense	GATCTG-----GATCACCATTGGATTCAAAATGAAGTTTCACCGAACAAGATGCTAAACAA	174
S17_Solanum_chilense	CGGTTTAATCTTGACAAGCGCTGGCCTCAGTTAGAAAAACAAAAAATTTCTTTGGCA	171
S6_Solanum_chilense	TTTGTTAAGCGGAACAAGCACTGGCCTGACTTGATCCTCACCGAAGCTGCTTCTCTGAAA	168
S8_Solanum_chilense	TTTTATAAGCGGAACAAGCACTGGCCTGACTTGATCCTCACCGAAGCTGCTTCTCTGAAA	147
S34_Solanum_chilense	TTTGATAGGAGGAATAAGCACTGGCCTGACTTGTTCTTAAGAGAATCCGATGCTCAGGAT	168
S2_Solanum_chilense	TTTGAAAAAGAGGAACAAGCACTGGCCTGACTTGATGCGAAGCAAAAGATAAGTGTGGAT	168
S25_Solanum_chilense	TTTGAAAAAGAGGAACAAGCACTGGCCTGACTTGATGCGAAGCAAAAGATAAGTGTGGAT	129
S32_Solanum_chilense	CTCACTGAACCTGGATGCCCGCTGGCCTCAATTGACTTCCACCAAAATATTTGGGTGCAA	168
S29_Solanum_chilense	CTCAATAAACTGGAACCCGCTGGCCTCAATTGACTTAGACAAATCTAAAAAGTTTGAAT	171
S33_Solanum_chilense	CTCAATAAACTGGAATCCCGCTGGCCTCAATTGACTTCACACGAATATGACAGGTTTGAAT	171
S26_Solanum_chilense	CTGAAAAAATCTCGCATCTACTGGCCAGATTGACCACAGCGTAGTTAGT---ATAAAA	168
S15_Solanum_chilense	ATCAAACTACTGGAGCAACTGGCCCGATTGACCTCCAATCAAG-----GC	159
S27_Solanum_chilense	CTCAAAACAATTGGAGTATGACTGGCCTTAATTTGATCTCCAAGGAAGGTGATATTGATAAA	171
S28_Solanum_chilense	CGCAACAATTTGGAGTCTGACTGGCCTTAATTTGACCTCCAGGGCAGGTGAGATTAAAGAAA	156
S7_Solanum_chilense	TTAAATGCGCTAGACAACCGCTGGCCTCAACTCAGATACGATTATTTGGTATGGCATAGAT	177
S11_Solanum_chilense	AAATCTGAGCTGGACAACCGCTGGCCTCAACTCAGATACGAAAAATTTGATGGCATAGAG	180
S31_Solanum_chilense	CCAAAGGCTCTGGAATATCGTTGGCCTAACATAAACAATACCGAAGCTGTTTCAAAGAA	165
S9_Solanum_chilense	AAAGATGCTATTGAACTCCGCTGGCCTAACTTGACCACCACTGAATTAATTTCTAAGGAA	150
S16_Solanum_chilense	AAAGCATATCTGGAATACCGTTGGCCTTAACCTTGACCACCACTGAATTAATTTCTAAGAAA	168
S4_Solanum_chilense	ACAAATGATCTGTATGAACGATGGCCTGACTTGACCATCGAAAAAGATATTTGTTTGGAC	174
S10_Solanum_chilense	CAAAACAAGATATACGATCGCTGGCCTGACTTGAAAAAGAGCAAGTGGTTGTGTATGAAA	147
S23_Solanum_chilense	CAAAATAAAATGAACGATCGCTGGCCTGACTTGAGATATACCAAGAAATTTAGCCTGGAA	168
S12_Solanum_chilense	CAAAGTAACTGGACGATCGGTGGCCTGACTTGACTACCAACAATCAATGTCTATGAAA	126
S24_Solanum_chilense	CAAAGTAACTTGACGATCGCTGGCAAGATTGACTTCCACAAATCAATTACTATGAAA	168

*** * *

S30_Solanum_chilense	AAACAACCTTTATGGAACATGAATATCTAAAGCATGGATCCTGTTGTCAGAAAGTCATC	228
S3_Solanum_chilense	AAACAACCTTTATGGAACATGAATATCTAAAGCATGGAACTGTTGTCAGAAAGTCTAC	228
S21_Solanum_chilense	AAACAACCTTTATGGAACATGAATATCTAAAGCATGGATCCTGTTGTCAGAAAGTGTAC	228
S22_Solanum_chilense	GAGCAACCTTTATGGAACATGAATATCTAAAGCATGGATCCTGTTGTCAGAAATCTAC	228
S5_Solanum_chilense	GAACAACCTTTATGGAAGTATCAGTATTTAAAGCATGGATCCTGTTGTCAGAAATGTAC	186
S1_Solanum_chilense	AAACAACCTTTATGGGTCTATCAATATTTAAAGCATGGATCCTGTTGTCAGAAATGTAC	228
S14_Solanum_chilense	AAACAACCTTTATGGGTCTATCAATATTTAAAGCATGGATCCTGTTGTCAGAAATGTAC	186
S13_Solanum_chilense	AATCAACCTCTCTGGAGAGATCAATACAAAAAGCATGGAACGTTGTTTACCGCGCTAC	180
S18_Solanum_chilense	GATCAACCTCTCTGGAGAGATCAATACAAAAAGCATGGAACGTTGTTATATCGCGCTAC	234
S19_Solanum_chilense	AATCAACCTCTCTGGAGCCATGGATGATACAAAAAGCATGGAATGTGCTTTCAATCTTAC	240
S20_Solanum_chilense	AAACAACCTCTCTGGAACCAAGATACACAAGCATGGAAGGTGTTGTTTCAATCTCTAC	234
S17_Solanum_chilense	AAGCAACCATCTCTGGGAAAGGAATTAAGGATGGAACGTTGTCAGAAATTTGTAT	231
S6_Solanum_chilense	CGTCAAGGTTTCTGGAGATATCAATTAAGGATGGAACATGTTGTTGATCTCTTTC	228
S8_Solanum_chilense	CATCAAGGTTTCTGGGCGTACCAATTAAGGATGGAACATGTTGTTGATCTCTTTC	207
S34_Solanum_chilense	AAACAAAAATCTCTGGCGACATGAATACATAAAGCATGGAACGTTGTTGATCTCTTTC	228
S2_Solanum_chilense	AACCAAGAATTTCTGGAAACATGAATACATAAAGCATGGATCGTGTGTTGATGATCTTTC	228
S25_Solanum_chilense	AACCAAGATTTCTGGGATCATGGATATGTAAGCATGGATCGTGTGTTGTAATCTATTC	189
S32_Solanum_chilense	TTTCAAAGATTTCTGGGAATATGAATATAGAAAGCATGGAACGTTGTTGATGATCTTTC	228
S29_Solanum_chilense	GATCAGGAATTTCTGGAAATATGAATATGAAAGCATGGATGTTGTTGTAAGATGTCTAC	231
S33_Solanum_chilense	GATCAGACATTTCTGGAAATATGAATATGAAAGCATGGATGTTGTTGTAAGATGTCTAT	231
S26_Solanum_chilense	AACCAAGGCTTCTGGAAACATGAATTAACAAGCACGGAACGTTAGTATGGAACCTTAC	228
S15_Solanum_chilense	AGTGCAGAATTTCTGGAGATATCAATACAAAGACGGAACGTTAGTGTGGACCTATAT	219
S27_Solanum_chilense	TATCAGGATTTCTGGGATATGAATTAACAAGCATGGAACCTGCAGTACAAATCGTTAT	231
S28_Solanum_chilense	TACCAAGAATTTCTGGGATATGAATTAACAAGCATGGAACCTGCAGTATGGATCGTTAT	216
S7_Solanum_chilense	AAACAATATCAGTGGAAAAATGAATTCCTAAAAACATGGAACCTGTGGTATAAATCGCTAC	237
S11_Solanum_chilense	AAACAAGATCTCTGGGAAAAAGAAATTCCTAAAAACATGGTAGCTGTAGTATAAATCGCTAC	240
S31_Solanum_chilense	GATCAAGTTTCTGGGAAAACCAATACAAATAGCATGGAACATGTTGTTGATGATCTTTC	225
S9_Solanum_chilense	GATCAAGTTTCTGGGAAAAAGAAATTCCTAAAAACATGGAACATGTTGTTGATGATCTTTC	210
S16_Solanum_chilense	AATGAATTTTCTGGGAAAAAGGAATATAAAAAAGCATGGAACCTGTTGTTGATACCCCTCTAT	228
S4_Solanum_chilense	AAACAAAAATTTCTGGAGGTATGAATATAAATAAAGCATGGAACGTTGTTGTAAGCGACCTAC	234
S10_Solanum_chilense	GATCAAGAGTTCTGGGACATGAATTAATAAAGCATGGATCGTGCAGATGACGACGATAC	207
S23_Solanum_chilense	AAACAGAAGTTCTGGGACATGAATATAAATAAAGCATGGATCGTGCAGACGACGATAC	228
S12_Solanum_chilense	GAACAAAAAGTTTGGGACTATCAATACAAATAAAGCATGGAACCTGCTGCGAGAGCTCTAC	186
S24_Solanum_chilense	AGACAAGAGTTTGGGAAACACGAATACAAATAAAGCATGGTACCTGTTGCGATTCTCTAT	228

*** * * * * *

S30_Solanum_chilense	AATCAAAACACGTATTTTAGTCTAGCTTTGCGCTTAAAGACAGAATTGATCTTCTGAGA	288
S3_Solanum_chilense	GATCAAAACACGTATTTTCGTCTAGCTTTGCGCTTAAAGACAGGTTTGATCTGCTGAGA	288
S21_Solanum_chilense	GATCAAAACAGTATTTTAGTCTAAGCTTTGCGCTTAAAGATAGGTTTGATCTTCTGAGA	288
S22_Solanum_chilense	AACCAAAACACTTATTTTAGTCTTGCCCTGCGCTTAAAGACAGGTTTGATCTGCTGAAA	288
S5_Solanum_chilense	AACCAAAACGCGTATTTTCAGTCTAGCCCTGCGCTTAAAGACAGGTTTGATATTCTGAGA	246
S1_Solanum_chilense	AACCAAAACACGTATTTTAGTCTGCGCTTAAAGACAGGTTTGATCTTCTGAGA	288
S14_Solanum_chilense	AACCAAAACACGTATTTTAGTCTGGCATGCGCTTAAAGACAGGTTTGATCTTCTGAGA	246
S13_Solanum_chilense	AATCAGTTGCAGTATTTTACTAGCCATGCGACTGAAAGAAAAGTTTGATCTTTTGACA	240
S18_Solanum_chilense	AATCAGTTGCAGTATTTTACTAGCCATGCGACTGAAAGAAAAGTTTGATCTTTTGACA	294
S19_Solanum_chilense	GATCAGAGAGCATATTTTATAGCCATGCGCTTAAAGATAAATTTGATCTTTTGACA	300
S20_Solanum_chilense	GATCAGAACGCATATTTTACTAGCCATGCGCTTAAAGATAAATAGATCTTGTAAGA	294
S17_Solanum_chilense	AACCAAGCAACATACCTTTGATTTGGCCATGAATTTAATCGACAAGTTTCGATATTTTAACA	291
S6_Solanum_chilense	AATCAAGAAAAATATTTTGATTTAGCCTTGATCTTAAAGACAAATTCGATCTTTTGACA	288
S8_Solanum_chilense	AATCAAGAAAAATATTTTGATTTGGCGTTGATCTTAAAGACAGGTTTCGATCTTTTGACA	267
S34_Solanum_chilense	AATGAAACACAATTTCTTGATTTAGCATTTGGTCTTAAATGACAGGTTTGATCTTGTCAAG	288
S2_Solanum_chilense	AATGAAACACAATACCTTTGATTTAGCGTTGGTTTTAAAGACAGGTTTGATCTTCTGACG	288
S25_Solanum_chilense	AAAGAAGCACATACTTTGATTTAGCATTTAGTTCTTAAAGACAGGTTTGATCTTACTGACA	249
S32_Solanum_chilense	AATCAATCTATGATTTTGACATATCCATGAAATTAACAGATTTCGATTGATCTTTTGAAA	288
S29_Solanum_chilense	AATCAATCTCAATATTTTGATATAGCCATGAAATTTAAAGATTTCGATTGATCTTTTGAAT	291
S33_Solanum_chilense	GATCAATCTCAATATTTTGATATAGCCATGAAATTTAAAGATTCTATTGATCTTTTGAAT	291
S26_Solanum_chilense	AATCAAGAAGCATATTTTGATTTAGCCATGAAATTTAAAGACAAGTTTCGATCTTTTGAAG	288
S15_Solanum_chilense	AATCAAGAACAATATTTTGATTTAGCCATTTGAATTTAAAGAGAGGTTTGATCTTTTGAAA	279
S27_Solanum_chilense	AATCAAGACCAATATTTTGATTTAGCCCTCAAATTTAAAGAACAGTTTGATCTGTTGAAAT	291
S28_Solanum_chilense	AATCAAGACCAATATTTTGATTTAGCCCTCAAATTTAAAGAACAGTTTGATCTGTTGAAAT	276
S7_Solanum_chilense	AAACAACCAGCATATTTTGATTTAGCCATGAAGATAAAAGACAAGTTTGATTTATTTGGGA	297
S11_Solanum_chilense	AAACAAGAAGCATATTTTGATTTAGCCATGAAGATAAAAGACAAGTTTGATCTATTGGGA	300
S31_Solanum_chilense	GATCAAGCAGCATATTTTGATTTAGCCATTTATCTTAAAGACATGTTTGATCTTCTGAAA	285
S9_Solanum_chilense	GATCAAAATGCATATTTTAATTTAGCCATGGGCTTAAAGACAGGTTTGATCTTTTGAAT	270
S16_Solanum_chilense	GATCAAAATTTCTATTTTAAGTTAGCCGTGGACTTAAAGATAAATTTGATCTCTTTGAAT	288
S4_Solanum_chilense	AATCAAGAGCATATTTTGATTTAGCCGTGGCTTAAAGACAAGTTTGATCTTTTGAAA	294
S10_Solanum_chilense	GATCAAAAGCATATTTTCGATTAGCTATAAATTTGAAGGACAAGTTTGACCTTTTGACA	267
S23_Solanum_chilense	AATCAACAACAATATTTTAATTTAACCATGAAATTTACGAGACAAGTTTGATCTTTTGTCAT	288
S12_Solanum_chilense	AATCAGGCACAATATTTTAATTTACTATGAAATCTGAAAGACAATTTTGATCTTTTGAGA	246
S24_Solanum_chilense	AATCAAGAACAATATTTTAATCTAATATGATCTGAAAGACAATTTTGATCTTTTGAGT	288
	* * * * *	
S30_Solanum_chilense	ACTCTCAAATACATCGAATTGTTCTCGGATCAAATTTATACATTTAAAGAAATCGTTGA-	347
S3_Solanum_chilense	ACTCTCAAATACATCGAATTGTTCTCGGTTCAAGTTATACATTTAAAGAAATCTTTGA-	347
S21_Solanum_chilense	ACTCTCAAATACATCGAATTGTTCTCGGATCAAGTTATACATTTAAAGAAATCACTGA-	347
S22_Solanum_chilense	ACTCTCAAATACATCAAAATTTTCTCGGATCAAGTTATACATTTAAGCAAAATCTTTGA-	347
S5_Solanum_chilense	ACTCTTCAACTACATCAAAATTTTCTCGGATCAAGTTATACATTTAAGGAAATCTTTGA-	305
S1_Solanum_chilense	ACTCTCGAAATGCATAAAATTTTCTCGGATCAAGTTATACATTTTCAAGAAATCTTTGA-	347
S14_Solanum_chilense	ACTCTCGAAATGCATAAAGATTTTCTCGGATCAAGTTATACATTTTCAAGAAATCTTTGA-	305
S13_Solanum_chilense	ACTCTCAGAACCCATGGAATTTACTCTGGTACAAAACATACATATAAAAAATCCAAGA-	299
S18_Solanum_chilense	ACTCTCAGAACCCATGGAATTTACTCTGGTACAAAACATACATATAAAAAATCCAAGA-	353
S19_Solanum_chilense	ACTTTCAGAACTCATGGAATTTACTCCCGAACAAAGCATACATTTGATGAAATCCAAG-	359
S20_Solanum_chilense	ACTCTCAGAAATCATGGAATTTACCCAGGGACAAAGCATACATTTGATGAAATCAAAG-	353
S17_Solanum_chilense	ATACTTAGACATGAGGGAATCATCCCTGGAACGTACTATGTCATTAATAATGTCGAAGA-	350
S6_Solanum_chilense	ACATTCAGAAACAAAGGAATTTATCCCAAATCAACTGTACCATTAATAAATCCAAGA-	347
S8_Solanum_chilense	ACATTTAGAAACAAAGGAATTTATCCCAAATCAACTCATACAATTAATAAATCCAAGA-	326
S34_Solanum_chilense	ACTTTCGAAAGTCACGGAATAATTCCTCTATCTTCTCATACTGTTTCAAGAAATTCGAAA-	347
S2_Solanum_chilense	ACTTTCGAAATTCATGGAATTTGTTCTCGATCATCTCATACTGTTGATAAATTAAGAA-	347
S25_Solanum_chilense	ACTTTCGAAATTCACGGAATTTGTTCTGTATCATTTTCAATCTGTTGATAAATTAAGAA-	308
S32_Solanum_chilense	ATTCTAAGAACAAAGGGAATTAACCTGGATATACT-----TATACCGGTGACCAATC	342
S29_Solanum_chilense	ATTCTAAGAACACGTTAGAAATTTATACCTGGATTTAA-----TATACCGGTGACCAATC	345
S33_Solanum_chilense	ATTCTAAGAACAAATAGAAATCGTACCTGGATTTTCAAGTATAGTTATACCGGTGACCAATC	351
S26_Solanum_chilense	ATTCTTGGAGATAAGGGAATTTACTCCAAGAGCTGTTCTGATCTGTAAGCAAGTTGAAAC-	347
S15_Solanum_chilense	ACTCTCAAAATTCACGGAATTTACTCCATCAAAACATTAATACAGTTATAGATGTCGAAGA-	338
S27_Solanum_chilense	ATTCTTAGAAATCATGGATTTATTCGCGGGAATCTGTACTGTTAAAGATGTAGAAGA-	350
S28_Solanum_chilense	ATTCTTAGAAATCATGGATTTATTCGCGGGAATCTGTACTGTTAAAGATGTAGAAGA-	335
S7_Solanum_chilense	ACTCTGAGAAACATGGAATTAATCCTGGTTCAACTTATGAATTAATGACATAGAACG-	356
S11_Solanum_chilense	ACCCTCAGAAATCAAGGAATTTATCCTGGTTCAACTTATGAATTTGATGATTTGAACG-	359
S31_Solanum_chilense	ATTCTGCGGAACATGGTATTACTCTGGAACCGCCATCACACCTCTCGAAATATCCAA	345
S9_Solanum_chilense	GTTCTCAGGAAAAATGGTATTACTCTGGAACAAGTTATCTTACCTCTCGGAAATCGTA	330
S16_Solanum_chilense	ATTCTCGGAAACATGGTATTAGGCTGGAACAACATCATCTTACCTCTCAGAAATTTGCA	348
S4_Solanum_chilense	TCTTTGGGAAATCATGGAATTTATCCTGGATCGAAATATACCGTCCAGAAATCAATAA-	353
S10_Solanum_chilense	ACTCTCCGGAACATAGAAATTTATCCTGGATTCGCTTATACGTTTAAAGAAATTTGGGA-	326
S23_Solanum_chilense	GCTCTCCAAATCATGGAATTTACTCTGGATCAACTACTACGTTCAAGAAATTTGGACT-	347
S12_Solanum_chilense	ATTCTCAGATCTCATGGAATTTGTTCTGGATCAACTAGCACAAATTAAGAAATTTGAGGA-	305
S24_Solanum_chilense	ATCCTCAGAAATCATGGAATTTGTTCTGGATCAAGTAGCACTATTAAAGCAATTCGGGGA-	347
	* * * * *	

S30_Solanum_chilense	-----TGCCATCAAGACAGTTACTCACACAGATCCTGACGTCAA---GTGTAAA	393
S3_Solanum_chilense	-----TGCCGTCAAGACAGTTACGCAAAACACATCCTGACATCAA---GTGTACA	393
S21_Solanum_chilense	-----TGCCATCAAGACAGTTACTCAAACAGATCCCGATGTCAA---GTGTACA	393
S22_Solanum_chilense	-----TGCCGTCAAGACAGCTACTCAAATGGATCCTGACATTAA---ATGTACT	393
S5_Solanum_chilense	-----TGCCGTCAAGACAGCTACTCAAATGGATCCTGACCTTAA---GTGTACT	351
S1_Solanum_chilense	-----TGCCGTCAAGACAGCTACTCAAATGGATCCTGACCTTAA---GTGTACT	393
S14_Solanum_chilense	-----TGCCGTCAAGACAGCTACTCAAATGGATCCTGACCTTAA---GTGTACT	351
S13_Solanum_chilense	-----TGCTATTAAGACAGTCACTCAAGAGGTTCTCTGA---CCTCAAGTGCATT	345
S18_Solanum_chilense	-----TGCTATTAAGACAGTCACTCAAGAGGTTCTCTGA---CCTCAAGTGCATT	399
S19_Solanum_chilense	-----TGCTATCAAGACAGTTACTAATAATGTAGTTGTTGATCTCAAGTGTGTC	408
S20_Solanum_chilense	-----TGCTATTAAGACCGTTATTAATCAAGTAGATCCTGATCTCAAGTGCCTC	402
S17_Solanum_chilense	-----TGCCATCAAGAAAGTTACCCATCAACT---TCCTAAGCTCAACTGCCGA	396
S6_Solanum_chilense	-----AACCATCCGAACAGTTACTGGAGTGGT---TCCTAATCTCTCTGTACT	393
S8_Solanum_chilense	-----AACCATCCGACAGTTACTGGAGTGGT---TCCTAATCTCTCTGTACT	372
S34_Solanum_chilense	-----AACTATCAGGTCAG-----	361
S2_Solanum_chilense	-----AACTATCAGGTCAGTTACTGGGGTTCT---TCCTAATCTCTCTTGCATT	393
S25_Solanum_chilense	-----AACTATCAGGTCAGTTACTGGGGTTCT---TCCTAATCCCTCTTGCATT	354
S32_Solanum_chilense	AGTCGTGCCATTAAGTCAGTTACTCAAAATAA---TCCAAAC-----	381
S29_Solanum_chilense	AGTGCTGCCATCAAAAAAGTTAATCAAAAGGA---TCCAAACCCCAAGTGCAGT	396
S33_Solanum_chilense	AGTAGTGCCATCAAAAGAGTTACTCAAAAGGA---TCCAAACCCCAAGTGCAC-	401
S26_Solanum_chilense	-----TGCCATTAAGGGAATTACAAACGAGCT---TCCAAACCTCAACTGCGTT	393
S15_Solanum_chilense	-----AGCCATCAAGGCCGTAACAAAAGAGGT---TCCTAACCTCAACTGCATT	384
S27_Solanum_chilense	-----TGCCATTAAGGCAGTGACTGCACATGT---TCCTAACCTGAAGTGTATT	396
S28_Solanum_chilense	-----TGCCATTAAGGCAGTGACTGCACATGT---TCCTAACCTGAAGTGCATT	381
S7_Solanum_chilense	-----TGCTATAAAGACAGTTTCTATAGAGGT---TCCTAGCCTCAAGTGCATA	402
S11_Solanum_chilense	-----GGCTGTAAAGACAGTTTCTATAGAGGT---TCCTAGCCTCAAGTGCATA	405
S31_Solanum_chilense	AG---TGCTGTCAAATCGGAAACTCAAGGGGT---TCCAAATGTCAGCT-----	388
S9_Solanum_chilense	AA---TTCTATCAAGTCACTAATCAAGGGGT---TCCAAATCTAAGCTGCTAC	378
S16_Solanum_chilense	AA---TGCTATCAGGTCAGAAACTCAAGGGAT---TCCTAACATCAGCTGCTAT	396
S4_Solanum_chilense	-----CACCATCAAGACTGTAACGCAAGGGTA---TCCTAATCTCTCTTGCAGT	399
S10_Solanum_chilense	-----TGCTATCAAAACAGTTACGACGGTTTA---TCCAAACATGAAGTGCATT	372
S23_Solanum_chilense	-----TGCCATTGCTACAGTAACATAAGAAATT---TCCGAGCTAAAGTGCATT	393
S12_Solanum_chilense	-----GGCCATTGAGACAGTTACTAATAAGGTCTTTCCCTAACCTGAAGTGCATT	354
S24_Solanum_chilense	-----TGCTATTGAGACAGTTACTAATAAGGTCTTTCCCTAACCTGAAGTGCATT	396

* *

Annexe S3 : alignement de *DIR1L* dans le clade de la tomate

JABWTJ010000021.1_Solanum_sitiens	TTGGAATTGAAATGGCCAGT-----GCAGATTCCTTGTGTGGTTTAACAA	225
Sopen01g051580_S.penilii	TTGGAATTGAAATGGCCAGT-----GCAGATTCCTTGTGTGGTTT-ACAA	102
XM_006365448.2 ^{Solanum}	TTGGAATTGAAATGGCCAGT-----GCAGATTCCTTGTGTGGTTTAACAA	206
Solyc01g109390.2.1	TTGGAATTGAAATGGCCAGT-----GCAGATTCCTTGTGTGGTTTAACAA	225
XM_004230937.4_Solanum_lycopersicum_(LOC101249406)	TTGGAATTGAAATGGCCAGT-----GCAGATTCCTTGTGTGGTTTAACAA	187
SOLCI000531700_T001_S.chilense	TTGGAATTGAAATGGCCAGT-----GCAGATTCCTTGTGTGGTTTAACAA	103
XM_015229635.2_Solanum_pennellii_(LOC107028534)	TTGGAATTGAAATGGCCAGT-----GCAGATTCCTTGTGTGGTTTAACAA	166
Spil.0_pctg006F.1_pilon_S.pimpenellifolium	CAACAA-ATAAACTCAGGAGGTACGTACGAATCTTCAAATCTTGAATCCACCTTAATA	297
a12516_S.peruvianum	CAACAAATTAAACTCAGGAGGTACGTACGAATCTTCAAATCTTGAATCCACCTTAATA	224
	*** ** *	
JABWTJ010000021.1_Solanum_sitiens	TAAATGATTTAATGAC---ATGTAAGTCAGCAGTACT-GGGCCTAAACCATTGCCACCAT	281
Sopen01g051580_S.penilii	TAAATGATTTAATGAC---ATGTAAGTCAGCAGTACTGGGCCCAAACCATTGCCACCAT	159
XM_006365448.2 ^{Solanum}	TAAATGATTTAATGAC---ATGTAAGTCAGCAGTACTGGGCCCAAACCATTGCCACCAT	263
Solyc01g109390.2.1	TATATGATTTAATGAC---ATGTAAGTCAGCAGTACTGGGCCCAAACCATTGCCACCAT	282
XM_004230937.4_Solanum_lycopersicum_(LOC101249406)	TATATGATTTAATGAC---ATGTAAGTCAGCAGTACTGGGCCCAAACCATTGCCACCAT	244
SOLCI000531700_T001_S.chilense	TAAATGATTTAATGAC---ATGTAAGTCAGCAGTACTGGGCCCAAACCATTGCCACCAT	160
XM_015229635.2_Solanum_pennellii_(LOC107028534)	TAAATGATTTAATGAC---ATGTAAGTCAGCAGTACTGGGCCCAAACCATTGCCACCAT	223
Spil.0_pctg006F.1_pilon_S.pimpenellifolium	TTAGAAATTAAGCGGAGCAATTAGGTGAGTCAAGTTGCATTAGA-GGAAGATCCATA	356
a12516_S.peruvianum	TTAGAAATTAAGCGGAGCAATTAGGTGAGTCAAGTTGCATTAGATGGAAGTCCATA	284
	* * * **** * * * * *	
JABWTJ010000021.1_Solanum_sitiens	CTGATAAATGTTGTGCTGCTTTAACCAAAGCAGATTGCTTGCCTTGCACCTTCAAGA	341
Sopen01g051580_S.penilii	T-GATAAATGTTGTGCTGCTTTAACCAAAGCAGATT-TGCTTGCCTTGCACCTTCAAGA	217
XM_006365448.2 ^{Solanum}	CTGATAAATGTTGTGCTGCTTTAACCAAAGCAGATTGCTTGCCTTGCACCTTCAAGA	323
Solyc01g109390.2.1	CTGATAAATGTTGTGCTGCTTTAACCAAAGCAGATTGCTTGCCTTGCACCTTCAAGA	342
XM_004230937.4_Solanum_lycopersicum_(LOC101249406)	CTGATAAATGTTGTGCTGCTTTAACCAAAGCAGATTGCTTGCCTTGCACCTTCAAGA	304
SOLCI000531700_T001_S.chilense	CTGATAAATGTTGTGCTGCTTTAACCAAAGCAGATTGCTTGCCTTGCACCTTCAAGA	220
XM_015229635.2_Solanum_pennellii_(LOC107028534)	CTGATAAATGTTGTGCTGCTTTAACCAAAGCAGATTGCTTGCCTTGCACCTTCAAGA	283
Spil.0_pctg006F.1_pilon_S.pimpenellifolium	GCAAGAGTTGAATTAATCTTGAATCAGACAACATTGGCATATTCTTGAAGTGCAAAAGG	416
a12516_S.peruvianum	GCAAGAGTTGAATTAATCTTGAATCAGACAACATTGGCATATTCTTGAAGTGCAAAAGG	344
	* * * * * * * * * * * * * * * * *	
JABWTJ010000021.1_Solanum_sitiens	ATAGTCCAATGTTGTGT-ATTTTCAAGATTAATTCAACTCTTGCTATGGATCTTCCATCTA	400
Sopen01g051580_S.penilii	ATAGTCCAATGTTGTGTACTTTCAAGATTAATTCAACTCTTGCTATGGATCTTCCATCTA	277
XM_006365448.2 ^{Solanum}	ATAGTCCAATGTTGTGTACTTTCAAGATTAATTCAACTCTTGCTATGGATCTTCCATCTA	383
Solyc01g109390.2.1	ATAGTCCAATGTTGTGTACTTTCAAGATTAATTCAACTCTTGCTATGGATCTTCCATCTA	402
XM_004230937.4_Solanum_lycopersicum_(LOC101249406)	ATAGTCCAATGTTGTGTACTTTCAAGATTAATTCAACTCTTGCTATGGATCTTCCATCTA	364
SOLCI000531700_T001_S.chilense	ATAGTCCAATGTTGTGTACTTTCAAGATTAATTCAACTCTTGCTATGGATCTTCCATCTA	280
XM_015229635.2_Solanum_pennellii_(LOC107028534)	ATAGTCCAATGTTGTGTACTTTCAAGATTAATTCAACTCTTGCTATGGATCTTCCATCTA	343
Spil.0_pctg006F.1_pilon_S.pimpenellifolium	CAAGGGAATCTGCTTTGGTTAAA-GC-ACACAACATTATCAGATGG----TGGAATG	470
a12516_S.peruvianum	CAAGGGAATCTGCTTTGGTTAAA-GCAGCACAACATTATCAGATGG----TGGAATG	399
	*** ** * * * * * * * * * * * * * * *	
JABWTJ010000021.1_Solanum_sitiens	-----AAAATCATCAACTAGCCAAGGTCTTCATAATAATCC-----TCTATATA----	44
Sopen01g051580_S.penilii	-----AAAATCATCAACTAGCCAAGGTCTTCATAATAATCC-----TCTATATA----	0
XM_006365448.2 ^{Solanum}	-----AAAATCATCAACTAGCCAAGGTCTTCATAATAATCC-----TCTATATA----	26
Solyc01g109390.2.1	-----AAAATCATCAACTAGCCAAGGTCTTCATAATAATCC-----TCTATATA----	44
XM_004230937.4_Solanum_lycopersicum_(LOC101249406)	-----AAAATCATCAACTAGCCAAGGTCTTCATAATAATCC-----TCTATATA----	6
SOLCI000531700_T001_S.chilense	-----AAAATCATCAACTAGCCAAGGTCTTCATAATAATCC-----TCTATATA----	0
XM_015229635.2_Solanum_pennellii_(LOC107028534)	-----AAAATCATCAACTAGCCAAGGTCTTCATAATAATCC-----TCTATATA----	0
Spil.0_pctg006F.1_pilon_S.pimpenellifolium	GTTTTAAATAATTCGATAATTTATTGTGTTATTCATTTTGAGGCAATCAATTATATACAA	60
a12516_S.peruvianum	GTTTTAAATAATTCGATAATTTATTGTGTTATTCATTTTGAGGCAATCAATTATATACAA	0

JABWTJ010000021.1_Solanum_sitiens	---AGCCCTTAAACACTTTTCACAAAAACACACCACCAAAAAAAGAGCAAAAAAT	101
Sopen01g051580_S.penilii	---AGCCCTTAAACACTTTTCACAAAAACACACCACCAAAAAAAGAGCAAAAT	0
XM_006365448.2 ^{Solanum}	---AGCCCTTAAACACTTTTCACAAAAACACACCACCAAAAAAAGAGCAAAAT	81
Solyc01g109390.2.1	---AGCCCTTAAACACTTTTCACAAAAACACACCACCAAAAAAAGAGCAAAAT	100
XM_004230937.4_Solanum_lycopersicum_(LOC101249406)	---AGCCCTTAAACACTTTTCACAAAAACACACCACCAAAAAAAGAGCAAAAT	62
SOLCI000531700_T001_S.chilense	---AGCCCTTAAACACTTTTCACAAAAACACACCACCAAAAAAAGAGCAAAAT	0
XM_015229635.2_Solanum_pennellii_(LOC107028534)	---AGCCCTTAAACACTTTTCACAAAAACACACCACCAAAAAAAGAGCAAAAT	41
Spil.0_pctg006F.1_pilon_S.pimpenellifolium	AACAAACTTTTAAACTCCAACAGATATGTCATCTCAACAAACAAAGTCAAACTCAAT	120
a12516_S.peruvianum	-----CTCCAACAGGATGTCACCTCAACAAACAAACGTCACAACTTTAT	45

JABWTJ010000021.1_Solanum_sitiens	TGAAAT-----CGATCGATCGATCAATATGGAAGCAAAAGCAAACTTGGTCATAT--	151
Sopen01g051580_S.penilii	TGAAAT-----CGATCGATCGATCAATATGGAAGCAAAAGCAAACTTGGTCATAT--	28
XM_006365448.2 ^{Solanum}	TGAAAT-----CGATCGATCGATCAATATGGAAGCAAAAGCAAACTTGGTCATAT--	131
Solyc01g109390.2.1	AATTTG-----AAATCGATCGATCAATATGGAAGCAAAAGCAAACTTGGTCATAT--	150
XM_004230937.4_Solanum_lycopersicum_(LOC101249406)	AATTTG-----AAATCGATCGATCAATATGGAAGCAAAAGCAAACTTGGTCATAT--	112
SOLCI000531700_T001_S.chilense	AATTTG-----AAATCGATCGATCAATATGGAAGCAAAAGCAAACTTGGTCATAT--	28
XM_015229635.2_Solanum_pennellii_(LOC107028534)	AATTTG-----AAATCGATCGATCAATATGGAAGCAAAAGCAAACTTGGTCATAT--	91
Spil.0_pctg006F.1_pilon_S.pimpenellifolium	TAAATAACTAATAAGATCAACCACA-AAAGTTGATCAACA-TAAACTCTTGCCATAAAA	178
a12516_S.peruvianum	TAAATAACTAATAAGATCAACCACAACGTTGATCAACA-TAAACTCTTGCCATAAAA	104
	* * * * * * * * * * * * * * * * *	
JABWTJ010000021.1_Solanum_sitiens	-----TATTT-GCACCATTGGTTATAGTTGCAGCCA-----	180
Sopen01g051580_S.penilii	-----TATTT-GCACCATTGGTTATAGTTGCAGCCA-----	58
XM_006365448.2 ^{Solanum}	-----TATTT-GCACCATTGGTTATAGTTGCAGCCA-----	161
Solyc01g109390.2.1	-----TATTT-GCACCATTGGTTATAGTTGCAGCCA-----	180
XM_004230937.4_Solanum_lycopersicum_(LOC101249406)	-----TATTT-GCACCATTGGTTATAGTTGCAGCCA-----	142
SOLCI000531700_T001_S.chilense	-----TATTT-GCACCATTGGTTATAGTTGCAGCCA-----	58
XM_015229635.2_Solanum_pennellii_(LOC107028534)	-----TATTT-GCACCATTGGTTATAGTTGCAGCCA-----	121
Spil.0_pctg006F.1_pilon_S.pimpenellifolium	GTAATAATAAAAAACACATGACAAATAGGAACCAACACTTAAAAATTCAAAACA	238
a12516_S.peruvianum	GTAATAATAAAAAACACATGACAAATAGGAACCAACACTTAAAAATTCAAAACA	164
	* * * * * * * * * * * * * * * * *	

JABWTJ010000021.1 Solanum_sitiens	AATGCAAACTTGATTCACCTAATTGCTCCGCTTAATTATTAAG-----GTGGATTCA	452
Sopen01g051580 S.penilii	AATGCAAACTTGATTCACCTAATTGCTCCGCTTAA-----	311
XM_006365448.2Solanum	AATGCAAACTTGATTCACCTAATTGCTCCGCTTAATTAACTAGAGCGAATTGGGATT	443
Solyc01g109390.2.1	AATGCAAACTTGACTCACCTAATTGCTCCGCTTAATTTCTTAATTATTAAGGTGGATTCA	462
XM_004230937.4 Solanum_lycopersicum_(LOC101249406)	AATGCAAACTTGACTCACCTAATTGCTCCGCTTAATTTCTTAATTATTAAGGTGGATTCA	424
SOICI000531700 T001 S.chilense	AATGCAAACTTAATTCACCTAATTGCTCCGCTTAA-----	315
XM_015229635.2 Solanum_pennellii_(LOC107028534)	AATGCAAACTTGATTCACCTAATTGCTCCGCTTAATTTCTTAATTATTAAGGTGAATTCA	403
Sp11.0_pctg006F.1 pilon_S.pimpenellifolium	GTTTAGGCCAGATAC-----TGCTGACTTACATGTCATTAATCATATATTGTTAAA	523
a12516_S.peruvianum	GTTTAGGCCAGATAC-----TGCTGACTTACATGTCATTAATCATATTATTGTTAAA	452
	* * * *	
JABWTJ010000021.1 Solanum_sitiens	AGATTGAA-GATTCGTACTGATGATCACGTA-----CCCCTTAAT	491
Sopen01g051580 S.penilii	-----	311
XM_006365448.2Solanum	TGAAGATTAGTACTGACACGTACCCCTTTAATGAGTAGTGAGTGGTG---AATTAATGT	499
Solyc01g109390.2.1	AGATTTGAAGATTTCGTA-CGTACCTCC-----T	489
XM_004230937.4 Solanum_lycopersicum_(LOC101249406)	AGATTTGAAGATTTCGTA-CGTACCTCC-----T	451
SOICI000531700 T001 S.chilense	-----	315
XM_015229635.2 Solanum_pennellii_(LOC107028534)	AGATTTGAAGATTTCGTA-CGTACCTCC-----T	431
Sp11.0_pctg006F.1 pilon_S.pimpenellifolium	CCACACAAGGAATCTGCACG-GCCATTTCAA-TTCCAATGGCTGCAACTATAACCAATGT	581
a12516_S.peruvianum	CCACACAAGGAATCTGCACG-GCCATTTCAA-TTCCAATGGCTGCAACTATAACCAATGT	511
JABWTJ010000021.1 Solanum_sitiens	GAGTTTTAAATTGTTGTTGTTGAATATTTAGTGTTGG---TTCCCTGAGTACTTATG	548
Sopen01g051580 S.penilii	-----	311
XM_006365448.2Solanum	TTGGTTTAAATTGTTGTTGTTGAAATTTGAATTTAAGTGTGTGGTTCCTATAGTCATGT	559
Solyc01g109390.2.1	GAGTTTTAAATTGTTGTTGTTGTTGAAT---TTTAAAGTGTGTGGTTCCTATTGTCATGT	545
XM_004230937.4 Solanum_lycopersicum_(LOC101249406)	GAGTTTTAAATTGTTGTTGTTGTTGAAT---TTTAAAGTGTGTGGTTCCTATTGTCATGT	507
SOICI000531700 T001 S.chilense	-----	315
XM_015229635.2 Solanum_pennellii_(LOC107028534)	GAGTTTTAAATTGTTGTTGTTGTTGAAT---TTTAAAGTGTGTGGTTCCTATTGTCATGT	487
Sp11.0_pctg006F.1 pilon_S.pimpenellifolium	TGCAAAATAATGACCAAGTTTGTCTTCCATATTG-----ATCGATCGATTT	633
a12516_S.peruvianum	TGCAAAATAATGACCAAGTTTGTCTTCCATATTG-----ATCGATCGATTT	563
JABWTJ010000021.1 Solanum_sitiens	TGTTTTTTTTTATGTTTACTTTTATGGCAAGAGTTTATGTTGATCAACTTTGTGGTT	608
Sopen01g051580 S.penilii	-----	311
XM_006365448.2Solanum	GCITTTGTTTTATTATTTTACTTTTATGGTAAGAATTATGTTGATCAACTTTGTGGTT	619
Solyc01g109390.2.1	GCITTTGTTTTATTATGTTACTTTTATGGCAAGAGTTTATGTTGATCAACTTTGTGGTT	605
XM_004230937.4 Solanum_lycopersicum_(LOC101249406)	GCITTTGTTTTATTATGTTACTTTTATGGCAAGAGTTTATGTTGATCAACTTTGTGGTT	567
SOICI000531700 T001 S.chilense	-----	315
XM_015229635.2 Solanum_pennellii_(LOC107028534)	GCITTTGTTTTATTATTTACTTTTATGGCAAGAGTTTATGTTGATCAACTTTGTGGTT	547
Sp11.0_pctg006F.1 pilon_S.pimpenellifolium	CAAAATTTTCTCTTTTCTCTTTT---GGTGGTGTGGTTTTTATGAAAGTGGTTAAGGG	691
a12516_S.peruvianum	CAAAATTTTCTCTTTTCTCTTTT---GGTGGTGTGGTTTTTATGAAAGTGGTTAAGGG	615
JABWTJ010000021.1 Solanum_sitiens	GATCTAATTAGTTATTTTAAAGTTTGACGTTT---TGTTTGTGAGGT-----	655
Sopen01g051580 S.penilii	-----	311
XM_006365448.2Solanum	GATCTTAATAGTTATTTTAAATAAACTTTGACGTTTTGTTGTTGA-----	665
Solyc01g109390.2.1	GATCTTAATAGTTATTTTAAATAAGT-TTGACTTTTTGTTGTTGAGATGACATACCTGT	664
XM_004230937.4 Solanum_lycopersicum_(LOC101249406)	GATCTTAATAGTTATTTTAAATAAGT-TTGACTTTTTGTTGTTGAGATG-----	617
SOICI000531700 T001 S.chilense	-----	315
XM_015229635.2 Solanum_pennellii_(LOC107028534)	GATCTTAATAGTTATTTTAAATAAGT-TTGACTTTTTGTTGTTGAGGTGA-----	597
Sp11.0_pctg006F.1 pilon_S.pimpenellifolium	CTTATATAAAGGAGTATTATGAAGACCTTGGCTAGTTGTTGATTTT-----	737
a12516_S.peruvianum	-----	615
JABWTJ010000021.1 Solanum_sitiens	-----	655
Sopen01g051580 S.penilii	-----	311
XM_006365448.2Solanum	-----	665
Solyc01g109390.2.1	TGGAGTTTTAAAGTTTGTGTTGATATAATTGATGCGCTCAAAATGAATAACACAATA	724
XM_004230937.4 Solanum_lycopersicum_(LOC101249406)	-----	617
SOICI000531700 T001 S.chilense	-----	315
XM_015229635.2 Solanum_pennellii_(LOC107028534)	-----	597
Sp11.0_pctg006F.1 pilon_S.pimpenellifolium	-----	737
a12516_S.peruvianum	-----	615
JABWTJ010000021.1 Solanum_sitiens	-----	655
Sopen01g051580 S.penilii	-----	311
XM_006365448.2Solanum	-----	665
Solyc01g109390.2.1	AATTATCGAATTATTAAC	744
XM_004230937.4 Solanum_lycopersicum_(LOC101249406)	-----	617
SOICI000531700 T001 S.chilense	-----	315
XM_015229635.2 Solanum_pennellii_(LOC107028534)	-----	597
Sp11.0_pctg006F.1 pilon_S.pimpenellifolium	-----	737
a12516_S.peruvianum	-----	615

